

Charakterisierung der photoakustischen Eigenschaften von Kontrastmitteln

Aus der Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie
(Direktor: Prof. Dr. Dr. Jörg Wiltfang)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**Charakterisierung der photoakustischen Eigenschaften
von Kontrastmitteln**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Würde eines Doktors der Zahnheilkunde
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

Lukas Baltz

aus Rendsburg

Kiel 2017

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Yahya Acil

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Oula Penate Medina

Tag der mündlichen Prüfung: 15.06.2018

Zum Druck genehmigt, Kiel, den

gez.: _____

(Vorsitzender der Prüfungskommission)

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Sonographie und ihre Limitationen	1
1.2. Optische Bildgebung und Kontrastmittel	1
1.3. Photoakustik und Kontrastmittel.....	3
1.4. Nanopartikel-basierte Kontrastmittel	7
1.5. Zielsetzung.....	8
2. Material und Methoden	9
2.1. Phantomentwicklung	9
2.1.1. Agarose-basiertes Phantom	9
2.1.2. Schlauch-basiertes Phantom.....	9
2.2. Kommerzielle Fluoreszenz- und Photoakustik-Kontrastmittel	11
2.2.1. Alexa Fluor® 488 Streptavidin, 10 nm kolloidales Goldkonjugat	12
2.2.2. Genhance™ 680	12
2.2.3. IntegriSense™ 750.....	13
2.2.4. Irdye® 800CW Carboxylate.....	14
2.2.5. Irdye® 800CW EGF	14
2.2.6. Irdye® 800CW RGD.....	15
2.2.7. ICG-Pulsion®	16
2.2.8. Methylenblau	16
2.3. Herstellung Nanopartikel-basierter Kontrastmittel.....	16
2.3.1. Generelles Verfahren	16
2.3.2. Anionische Sphingomyelin Liposomen	17
2.3.3. Kationische Phosphatidylcholin Liposomen.....	18
2.3.4. Thermosensitive Liposomen.....	18
2.3.5. Liposomen mit Magnetpartikeln.....	18
2.4. Erstellung der Verdünnungsreihen.....	19
2.5. Absorptionsmessung	20
2.6. Photoakustische Messung	21
2.6.1. Versuchsaufbau	21
2.6.2. Photoakustik.....	21

2.7.	Statistische und graphische Auswertung	23
3.	Ergebnisse	24
3.1.	Entwicklung eines Phantoms für photoakustische Messungen.....	24
3.2.	Evaluierung des Systems mittels etablierter Photoakustik- Kontrastmittel	25
3.2.1.	Evaluierung des Korrekturalgorithmus und der Schallköpfe	26
3.2.2.	Zusammenhang zwischen Absorption und photoakustischer Signalintensität	30
3.3.	Evaluierung der kommerziellen Fluoreszenzfarbstoffe und Nanopartikel.....	32
3.3.1.	Kommerzielle Fluoreszenzfarbstoffe	33
3.3.2.	Nanopartikel-basierte Kontrastmittel	35
3.3.3.	Vergleich aller Parameter und Kontrastmittel	37
4.	Diskussion	39
4.1.	Entwicklung eines Phantoms für photoakustische Messungen.....	39
4.2.	Evaluierung des Korrekturalgorithmus	41
4.3.	Vergleich der Schallköpfe	42
4.4.	Zusammenhang zwischen Absorption und photoakustischer Signalintensität.....	44
4.5.	Evaluierung der kommerziellen Fluoreszenzfarbstoffe und Nanopartikel.....	46
5.	Zusammenfassung.....	49
6.	Literaturverzeichnis	51
7.	Anhang	55
7.1.	Abbildungsverzeichnis	55
7.2.	Tabellenverzeichnis	56
7.3.	Abkürzungsverzeichnis	57
7.4.	Danksagung.....	59
7.5.	Eidesstattliche Erklärung	58
7.6.	Lebenslauf	59

1. Einleitung

1.1. Sonographie und ihre Limitationen

Bei der Sonographie handelt es sich um ein seit langem in der Klinik etabliertes, nicht-invasives Bildgebungsverfahren. Neben der klinischen Anwendung ist die Sonographie auch zur morphologischen Charakterisierung von Tumoren im Tiermodell etabliert. Eine funktionale Bildgebung wird über die Gabe von Kontrastmitteln (KM) ermöglicht, wobei es sich meist um gasgefüllte Mikrobläschen („*microbubbles*“) handelt. Die akustische Impedanz der in die Bläschen eingeschlossenen Gase unterscheidet sich sehr stark zu der der umgebenden Gewebe, wodurch hyperechogenen Bereiche entstehen (Kang und Yeh 2012). Über die Kopplung spezifischer Antikörper (Zhou et al. 2015) oder Liganden (Chang et al. 2013) können Ultraschall KM auch im Bereich der molekularen Bildgebung verwendet werden, wo sie beispielsweise gezielt Zelltypen oder pathologische Strukturen markieren. Limitiert wird die Anwendung der Sonographie vor allem durch Gewebe mit sehr hoher Impedanz, wie zum Beispiel Knochen und die tiefe Lage mancher Organe. Desweiteren muss beim Ultraschall immer zwischen hoher Auflösung und hoher Eindringtiefe abgewogen werden, da die Penetranz negativ mit der Frequenz korreliert.

1.2. Optische Bildgebung und Kontrastmittel

Eine Möglichkeit funktionale *in vivo* Daten auch tiefer liegender Strukturen zu erhalten, ist die optische Bildgebung. Im Tiermodell werden zur molekularen, funktionalen und quantitativen Bildgebung vor allem Biolumineszenz- und Fluoreszenz-basierte Verfahren eingesetzt (Weissleder und Mahmood 2001). Auch in der Klinik hat die Fluoreszenzbildgebung mit der Zulassung von Indocyaningrün (Cardiogreen, ICG) Einzug gehalten. Etabliert ist dieses KM zum Beispiel bereits im

Bereich der Angiographie, Leberfunktions- und Perfusionsdiagnostik (Marshall et al. 2010).

Für die *in vivo* Anwendung werden bevorzugt Fluoreszenzfarbstoffe genutzt deren Absorptionsspektrum sich im nahen Infrarot (NIR), also bei Wellenlängen über 760 Nanometer (nm), befinden. In diesem Bereich hat Licht eine hohe Gewebepenetration, zugleich wird im Gewebe nur eine geringe Autofluoreszenz ausgelöst. Für die molekulare Bildgebung werden NIR-Fluorophore an spezifische Liganden, wie Antikörper, Proteine oder kleine Moleküle gekoppelt. Dies erlaubt eine Bindung an definierte Zielstrukturen (Weissleder und Ntziachristos 2003). Seit dem Beginn der optischen Bildgebung wurde eine Vielzahl an Fluoreszenz-Sonden entwickelt, die sehr spezifisch molekulare Ziele oder physiologische Abläufe darstellen können. Dabei findet immer mehr eine Optimierung in Richtung einer klinischen Anwendung statt (Zhu und Sevick-Muraca 2015). Der Anspruch an diese „*Molecular Probes*“ ist eine gute Biokompatibilität, eine hohe Spezifität sowie eine hohe Quantenausbeute. Dementsprechend werden Fluorophore für die optische Bildgebung so gewählt, dass sie möglichst viel Energie des Anregungslichtes aufnehmen und diese in Form von Photonen emittieren. Energie die nicht als Fluoreszenz abgegeben werden kann, wird vom Molekül in Form von Wärme freigesetzt. Der Schwachpunkt der optischen Bildgebung liegt in der mangelnden Darstellung der Morphologie, weshalb sie meist mit einem weiteren bildgebenden Verfahren, wie Computertomographie oder Magnetresonanztomographie, ergänzt wird (Schulz et al. 2010; Taruttis und Ntziachristos 2012).

Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Fluoreszenz KM setzten wir bereits zur Markierung und optischen Darstellung des orthotopen Plattenepithelkarzinoms im Mundboden bei Mäusen ein (Will et al. 2016). Bei diesen Tierversuchsprojekten wurden die Tumore mittels einer Fluoreszenz-Kammer (NightOWL™ LB 983, Berthold Technologies GmbH) und eines Fluoreszenz-Mikroskops dargestellt. Zur Etablierung der photoakustischen Bildgebung in diesem Modell haben wir nach Kontrastmitteln gesucht, die sowohl zur photoakustischen als auch zur optischen Detektion geeignet sind. Im Folgenden werden die einzelnen verwendeten Fluoreszenz KM kurz vorgestellt. Eine ausführliche Beschreibung erfolgt im Material und Methoden Teil. In alphabetischer Reihenfolge wurden Alexa Fluor® 488

Streptavidin mit einem 10 nm kolloidalen Goldkonjugat, Genhance™ 680, IntegriSense™ 750, IRDye® 800CW Carboxylate, IRDye® 800CW EGF und IRDye® 800CW RGD untersucht. Das Alexa Fluor® 488 mit Goldkonjugat sollte als KM unterhalb des NIR-Bereichs getestet werden, wobei ein verstärkter photoakustischer Effekt durch das konjugierte Edelmetall erwartet wurde. Durch Genhance™ 680, IntegriSense™ 750 und die Varianten des IRDye® 800 wurden drei weitere Wellenlängenbereiche knapp unter beziehungsweise im NIR-Bereich in den Versuch eingeschlossen.

Genhance™ 680 und IRDye® 800CW Carboxylate markieren das Blutvolumen und können daher für die Darstellung der Vaskularisierung beziehungsweise Angiogenese im Tumorgewebe verwendet werden.

IntegriSense™ 750 und IRDye® 800CW RGD binden an Integrine. In einigen Tumoren werden spezifische Integrine, wie $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_5\beta_1$ oder $\alpha_v\beta_6$, überexprimiert. In adulten Epithelien sind diese Integrine normalerweise kaum nachweisbar. (Desgrosellier und Cheresch 2010) In dieser Arbeit wurden die Integrin-Farbstoffe als potentielle Tumormarker ausgewählt, da ihre Expression auch in oralen Plattenepithelkarzinomen nachgewiesen wurde (Amaral Pereira et al. 2013).

IRDye® 800CW EGF enthält den epidermalen Wachstumsfaktor (*epidermal growth factor, EGF*), dessen Verwendbarkeit als Tumormarker bereits im Tiermodell zum Beispiel für orale Plattenepithelkarzinome und hepatozelluläre Karzinome gezeigt wurde (Rowinsky 2004; Zhang et al. 2012; Zhao et al. 2013).

1.3. Photoakustik und Kontrastmittel

Die Photoakustik (PA) verbindet Ultraschall und optische Bildgebung. Hierbei handelt es sich um eine vergleichsweise neue Methode, die der Gewinnung zusätzlicher Informationen auch aus tieferen Gewebeschichten dienen soll (Zackrisson et al. 2014). Ein pulsierender Laser gibt Photonen an Moleküle im Gewebe ab, die sich durch die absorbierte Energie minimal erwärmen. Dadurch kommt es zu einer kurzen thermoelastischen Expansion, die eine mechanische Druckwelle in die Umgebung

sendet. Diese Druckwelle befindet sich im Ultraschallbereich und kann daher mit einem Schallkopf aufgefangen und in ein Bild umgewandelt werden. Da verschiedene Gewebe je nach ihrer Zusammensetzung sehr unterschiedliche Absorptionseigenschaften aufweisen, bergen die erzeugten Schallwellen Informationen über dessen Beschaffenheit (Xia et al. 2014). Eine der grundlegenden *in vivo* Anwendungen der Photoakustik ist die nicht-invasive Bestimmung der Sauerstoffsättigung im Blut (Wang et al. 2006). Hierfür wird ausgenutzt, dass die PA Spektren von Hämoglobin im oxygenierten und desoxygenierten Zustand im sichtbaren Bereich sehr unterschiedliche Verläufe zeigen (Abb. 1).

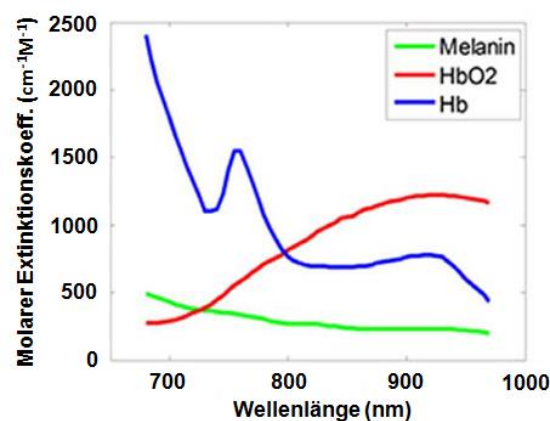


Abb. 1: Photoakustische Spektren von oxygeniertem Hämoglobin (HbO_2 , rot), desoxygeniertem Hämoglobin (Hb, blau) und Melanin (grün). Abbildung modifiziert von Paproski et al. 2014.

Ein eingebauter Algorithmus (*Oxy-Hemo-Mode*) nutzt dafür das PA Signal bei 750 nm für desoxygeniertes Hämoglobin und bei 850 nm für oxygeniertes Hämoglobin.

Diese Arbeit wurde am Vevo®2100 Kleintierultraschallgerät in Kombination mit dem Vevo®LAZR, beides Geräte der kanadischen Firma FUJIFILM Visual Sonics Inc., durchgeführt (Abb. 2). An das Vevo®2100 wurde ein spezieller Schallkopf (LZ250 oder LZ550, Abb. 3) angeschlossen, welcher eine simultane Aufnahme von Ultraschall- und Photoakustikbildern ermöglicht.



Abb. 2: Vevo®2100 Kleintierultraschallgerät (rechts) mit Vevo®LAZR für die Photoakustik (links). Abbildung des Herstellers: www.visualsonics.com

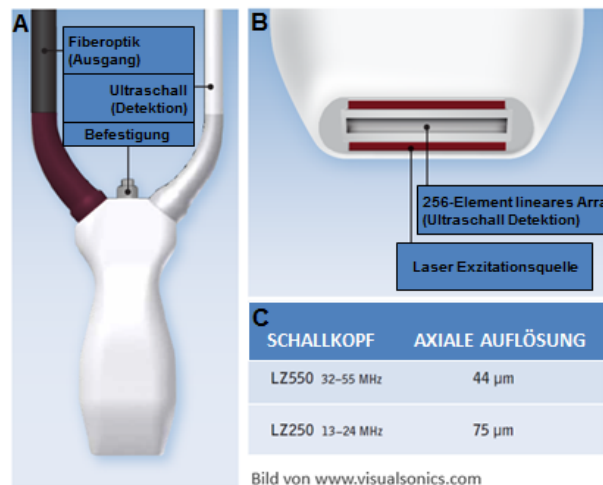


Abb. 3: Schallköpfe für die Photoakustik mit simultanem Ultraschall. A: Aufbau des Schallkopfes mit fiberoptischem Ausgang, der die Laser Exzitation sendet (linkes Kabel), Ultraschalldetektion (rechtes Kabel) und Befestigungsschraube zur Anbringung eines Motors für die 3D-Bildgebung (Mitte); B: Exemplarische Nahaufnahme des Schallkopfes mit außen liegenden Exzitationsquellen für das Laserlicht und innen liegenden piezoelektrischen Elementen für die Ultraschalldetektion; C: Verfügbare Laserschallköpfe mit Frequenzbereich und lateralem Auflösungsvermögen. Modifizierte Abbildung des Herstellers: www.visualsonics.com

Der Vevo®LAZR verfügt über einen Nd/YAG-Laser (Neodym-dotierter Yttrium-Aluminium-Granat-Laser) der Laserlicht zwischen 680 und 970 nm Wellenlänge erzeugen kann. Ein fiberoptisches Bündel leitet im Nanosekundenbereich pulsierende Laserimpulse auf zwei longitudinal entlang der Seite des Kopfes laufende fiberoptische Dioden. Der LZ250 Schallkopf besitzt darüber hinaus einen

Ultraschallausgang, der Schallwellen in einer Frequenz von 13 bis 24 MHz aussendet. Äquivalent aufgebaut sendet der LZ550 Schallkopf Wellen im Bereich von 32 bis 55 MHz. Ein Ultraschalldetektor wandelt über sensitive piezoelektrische Elemente die reflektierten, empfangenen Ultraschallwellen in elektrische Signale um, die zur Erzeugung eines ko-registrierten Bildes aus Ultraschall und PA dienen. Es besteht die Möglichkeit bei festen Wellenlängen das photoakustische Signal im zwei- oder dreidimensionalen Raum aufzuzeichnen. Desweiteren kann man bei einer Schichtaufnahme eine Spektralphotometrie durchzuführen, bei der bei allen verfügbaren Wellenlängen die Intensität des photoakustischen Signals gemessen wird. Für manuell definierte Bereiche des Bildes können hieraus Intensitätskurven erstellt werden. Eine zusätzliche Funktion bietet optional eine mathematische Korrektur an, die für die leicht verschiedenen Energielevels des Lasers bei unterschiedlichen Wellenlängen kompensiert.

Als KM in der PA können Chromophore mit hoher Absorption, wie Melanin oder Methylenblau eingesetzt werden, aber potentiell auch alle für die Fluoreszenzbildgebung entwickelten Farbstoffe. Im Folgenden werden die etablierten PA KM kurz vorgestellt, welche Anwendung in dieser Arbeit fanden. Eine technischere Ausführung folgt im Material und Methoden Teil.

ICG wird neben der oben bereits erwähnten klinischen Anwendungen seit vielen Jahren auch in der präklinischen Forschung eingesetzt. Hier wurde ICG bereits als Tumormarker (Nakano et al. 2015; van der Vorst et al. 2012), für die Messung des zerebralen Blutflusses (Kang et al. 2015) oder als KM für die Lokalisation von Nanopartikeln (Sano et al. 2013; Hill et al. 2015) verwendet.

Desweiteren wurde in dieser Arbeit Methylenblau eingesetzt, welches als photoakustisch aktives KM zum Beispiel bereits für die Markierung von Wächter Lymphknoten publiziert wurde (Erpelding et al. 2010).

1.4. Nanopartikel-basierte Kontrastmittel

Bei den bisher beschriebenen KM handelte es sich um klein-molekulare KM, die nur aus einem Fluorophor oder einem an ein Fluorophor gekoppelten Molekül bestehen. Eine weitere Strategie um Farbstoffe an einem spezifischen Zielort im Körper anzureichern ist die „*targeted delivery*“ in Form von liposomalen Nanopartikeln. Bereits 1995 wurden mit Doxil®, liposomalem Doxorubicin, der erste Wirkstoff der Nanomedizin für die verbesserte Behandlung des Kaposi-Sarkom zugelassen (Bergin et al. 1995; Barenholz 2012). Der Vorteil eines Liposoms liegt darin, dass über die Größe, Zusammensetzung, Ladung und Oberflächenbeschaffenheit die Biodistribution beeinflusst werden kann. Ziel ist es hierbei die Zirkulationszeit zu verlängern, den Wirkstoff in therapeutisch wirksamen Dosen an den Zielort zu bringen, eine Extravasation und im besten Fall Akkumulation der Liposomen im Zielgewebe zu erreichen und dort eine lokale Freisetzung des aktiven Wirkstoffs zu bewirken (Barenholz 2012). Inzwischen sind etwa 15 Liposomen-basierte Formulierungen in klinischer Anwendung, darunter Krebstherapeutika, Fungizide, Impfstoffe und Analgetika (Kraft et al. 2014).

In dieser Arbeit wurden verschiedene Liposomen auf ihre photoakustischen Eigenschaften hin untersucht. Alle wurden für die Signalerzeugung mit ICG gefüllt und verfolgen eine Strategie für die spezifische Tumormarkierung. Im Folgenden werden die Liposomen kurz vorgestellt. Anionische Sphingomyelin Liposomen (SM Liposomen) bieten durch den Einbau von Sphingomyelin in die Lipidhülle bei der Anwendung im Organismus die Möglichkeit einer enzymatischen Aktivierung durch körpereigene Enzyme. In entzündetem oder tumorösem Gewebe wird Sphingomyelinase freigesetzt, ein Enzym welches vom Sphingomyelin den Botenstoff Ceramid abspaltet (Jenkins et al. 2009). Im SM Liposom bewirkt Sphingomyelinase dadurch die Öffnung der Lipidhülle. Bei den kationischen Phosphatidylcholin Liposomen (PC Liposomen) wurde ein Lipid ausgetauscht, um eine veränderte Oberflächenladung zu erhalten. Die veränderte Ladung sollte eine andere Stabilität und Biodistribution zur Folge haben, welche in späteren *in vivo* Versuchen eine Rolle spielen könnte (Rukavina und Vanic 2016; Narenji et al. 2016). Thermosensitive Liposomen (TS Liposomen) sind so aufgebaut, dass sie unter mäßiger Erhitzung ihren Inhalt freisetzen. Eine externe Hitzequelle kann demnach

die Freisetzung des Liposomeninhalts in einem Zielgewebe bewirken (Deshpande et al. 2013; Kneidl et al. 2014). Zudem wurden Liposomen mit magnetischen Nanopartikeln verschiedener Durchmesser untersucht (Micromod 20 nm und Micromod 100 nm Liposomen). Die Eisenoxidpartikel könnten durch starke Absorption ein besonders intensives photoakustisches Signal erzeugen. Zusätzlich bieten sie die Möglichkeit einer multimodalen Bildgebung in der Magnetresonanztomographie (MRT) (Kim et al. 2008).

1.5. Zielsetzung

In dieser Arbeit sollten verschiedene kommerziell erhältliche Fluoreszenzfarbstoffe auf ihre Eignung für den Einsatz als KM für die PA überprüft werden. Zusätzlich wurde das photoakustische Signal verschiedener lipidbasierter Nanopartikel, welche unter anderem zur Markierung von Tumorzellen oder Entzündungen eingesetzt werden könnten, evaluiert. Zur standardisierten, zuverlässigen und reproduzierbaren Untersuchung der verschiedenen Farbstoffe sollte zudem ein für die PA geeignetes Phantom entwickelt werden.

2. Material und Methoden

2.1. Phantomentwicklung

Bei der Entwicklung eines geeigneten Phantoms zur standardisierten Charakterisierung der KM wurden verschiedene Ansätze verfolgt. Eine Anforderung war die Identifikation eines geeigneten Umgebungsmediums, da dies für die Weiterleitung der Ultraschallwellen unverzichtbar ist. Desweiteren musste eine Möglichkeit gefunden werden ein genau definiertes Volumen bei konstanter Konzentration der Farbstoffe messen zu können. Da die photoakustische Signalintensität tiefenabhängig ist, war auch ein definierter Abstand zum Schallkopf nötig.

2.1.1. Agarose-basiertes Phantom

Zunächst wurde mit Agarose gearbeitet, die in Anlehnung an eine spätere *in vivo* Anwendung das Gewebe simulieren sollte. Hierfür wurde versucht die KM in Agarosegel zu lösen. Hierfür mussten die KM in das noch heiße Gel eingearbeitet werden bevor es beim Abkühlen erstarrte. Eine gewisse Thermostabilität wurde also vorausgesetzt. Ein direktes Einspritzen einer definierten Kontrastmittelmenge in ausgehärtete Agarosegele bot eine hitzefreie Alternative. Beides wurde jedoch verworfen, da die Agarose viele Artefakte produzierte. Beim Einspritzen riss zudem die Agarose und das KM verblieb weder in der gewünschten Position noch Ausgangskonzentration.

2.1.2. Schlauch-basiertes Phantom

Als nächstes wurde ein System aus Schläuchen entworfen, die sich in einen Halter einführen lassen sollten. Die Schläuche sollten nur ein geringes Volumen des KMs aufnehmen und wenige Millimeter vom Schallkopf entfernt in einer

standardisierten Tiefe positioniert werden können. Der Vorteil der Schläuche wurde darin gesehen, dass an jeder Stelle des Schlauches das Volumen und die Konzentration des Farbstoffes konstant wären und ein Vermischen oder Wegdiffundieren in umgebende Medien verhindert wäre.

Die Halterung sollte hierbei lediglich dem Zweck dienen die Schläuche in definierter Position zu halten, durfte aber ebenfalls kein zu großes photoakustisches Störsignal erzeugen. Der erste Versuch wurde mit Optosil Comfort Putty (Heräus Kulzer GmbH, Hanau, Deutschland), welches mit Activator Universal Plus (Heräus Kulzer GmbH, Hanau, Deutschland) zum Aushärten gebracht wurde, durchgeführt. Hierbei handelt es sich um ein Knetsilikon welches in der Zahnmedizin für den oralen Gebrauch zugelassen ist. Zusätzlich wurde eine Halterung aus Plexiglas entworfen. Die im Weiteren beschriebenen Versuche wurden mit bis zu fünf in diese Plexiglashalterung eingespannten Schläuchen durchgeführt.

Im nächsten Schritt musste ein geeigneter Schlauch gefunden werden. Hierfür wurden kurze Stücke der Schläuche in die Plexiglashalterung eingespannt und mit destilliertem Wasser oder PBS gefüllt. Beide Seiten der Schlauchstücke wurden mit Knetsilikon verschlossen und die bestückte Halterung in einem Bad aus destilliertem Wasser versenkt. Dabei wurde der Füllstand so hoch gewählt, dass der gesamte Laserschallkopf mit seinen eingelassenen Elektroden in Wasser eingetaucht war. Sollten sich Luftblasen unter dem Schallkopf gebildet haben, wurden diese vorsichtig mit einer stumpfen Kanüle entfernt. Im Anschluss erfolgte eine Messung des photoakustischen Spektrums über alle Wellenlängen (680 - 970 nm in 5 nm Intervallen). Die Vorgaben an das Material waren hier ein geringes bis abwesendes intrinsisches photoakustisches Signal, ausreichende Steifigkeit um in der Halterung horizontal stabil einspannbar zu sein und eine kostengünstige Verfügbarkeit in ausreichenden Mengen. Zunächst wurde ein Polyethylen (PE) Schlauch mit 0,4 mm Durchmesser (Carl Stuart Co., Staffordshire, United Kingdom) getestet. Desweiteren wurde ein Mauskatheter (MICRO-FLO™, Ind. Biomedica SpA, Gemonia, Italien) aus Polyvinylchlorid (PVC) mit einem Innendurchmesser von 0,6 mm und der TYGON®-Schlauch R3607 (PRO Liquid GmbH, Überlingen, Deutschland) mit einem Innendurchmesser von 0,64 mm und einer Wanddicke von 0,91 mm im System getestet. Bei dem TYGON®-Schlauch R3607 handelt es sich um einen flexiblen,

hochtransparenten Laborschlauch, der durch eine sehr glatte Innenfläche eine Ablagerung von Partikeln verhindert. Das photoakustische Signal des Schlauchmaterials war an der unteren Nachweisgrenze und im späteren Bild mit KM nicht mehr sichtbar, daher wurde die Charakterisierung der KM im Folgenden mit den TYGON®-Schläuchen durchgeführt.

2.2. Kommerzielle Fluoreszenz- und Photoakustik-Kontrastmittel

Eine Auflistung aller verwendeten Fluoreszenz- beziehungsweise PA KM mit Angabe des Herstellers kann Tabelle 1 entnommen werden. Die KM wurden bei Bedarf gemäß den Angaben des jeweiligen Herstellers gelöst, falls sie in lyophilisierter Form geliefert wurden oder vorverdünnt werden mussten. Es handelt sich um kommerziell erhältliche Farbstoffe, daher stammen alle Informationen über Konzentration und Absorptionsspektren von den jeweiligen Herstellern.

Tab. 1: Kommerzielle Fluoreszenz- und Photoakustikkontrastmittel.

Reagenz	Hersteller	Katalognummer
Alexa Fluor® 488 Streptavidin, 10 nm colloidal gold conjugate	Thermo Fisher Scientific Inc.	A-32361
Genhance™ 680	PerkinElmer, Inc.	NEV10117
ICG-Pulsion®	PULSION Medical Systems SE	535882
IntegriSense™ 750	PerkinElmer, Inc.	NEV10873
IRDye® 800CW Carboxylate	LI-COR Biotechnology - GmbH	P/N 929-08972
IRDye® 800CW EGF	LI-COR Biotechnology - GmbH	P/N 926-08446
IRDye® 800CW RGD	LI-COR Biotechnology - GmbH	P/N 926-09889
Methylthioniniumchlorid Proveblue (Methylenblau)	Dr. F. Köhler Chemie GmbH	10179678

2.2.1. Alexa Fluor® 488 Streptavidin, 10 nm kolloidales Goldkonjugat

Das an Streptavidin konjugierte Alexa Fluorophor (Alexa Fluor® 488) wird für den Nachweis von Proteinen genutzt, welche Biotin-markiert sind. Die maximale Fluoreszenz von 519 nm wird bei einer Exzitation von 495 nm freigesetzt (Abb. 4). Die Absorption bildet ihren Peak bei 496 nm aus. Zusätzlich ist der Farbstoff an ein Goldkolloid mit 10 nm Durchmesser gekoppelt. Das Gold ermöglicht verschiedene Mikroskopietechniken und Immunblots.

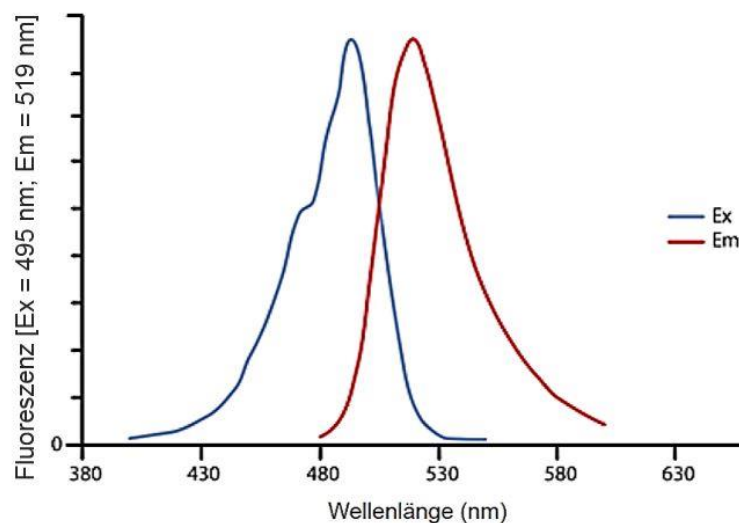


Abb. 4: Absorptions- (blau) und Emissionsspektrum (rot) des Alexa Fluor® 488. Modifizierte Abbildung des Herstellers (Homepage: <https://www.jacksonimmuno.com/img/static-pages/alexafluor488-spectra.png>).

2.2.2. Genhance™ 680

Bei Genhance™ 680 handelt es sich um den Kontrollfarbstoff zu einem für die Kopplung an spezifische Proteine oder Antikörper vorgesehenen Fluorochrom. Während die funktionale Variante aus einem Amin besteht, ist Genhance™ 680 als saure Form nicht speziell reaktiv. Somit eignet es sich als Kontrolle des gekoppelten Farbstoffs oder um generell das zirkulierende Blutvolumen zu markieren. Die Emission bei 688 ± 5 nm wird bei einer optimalen Exzitationswellenlänge von 670 ± 5 nm gemessen, maximal absorbiert wird eine Wellenlänge von 670 ± 5 nm (Abb. 5).

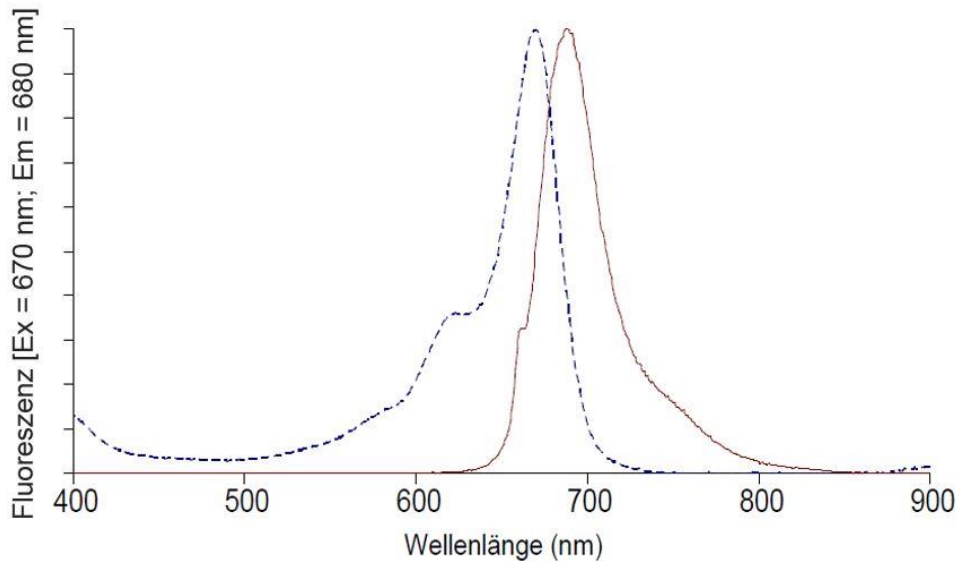


Abb. 5 : Absorptions- (blau, gestrichelt) und Emissionsspektrum (rot) Genhance™ 680. Modifizierte Abbildung des Herstellers (Homepage: [http://www.perkinelmer.de/lab-solutions/resources/docs/TCH_NEV10117-Genhance680 1mg-TD.pdf](http://www.perkinelmer.de/lab-solutions/resources/docs/TCH_NEV10117-Genhance680%201mg-TD.pdf)).

2.2.3. IntegriSense™ 750

IntegriSense™ 750 bindet an das $\alpha_v\beta_3$ Molekül, ein Integrin welches auf Blutplättchen exprimiert wird und vermutlich eine Rolle bei der Unterdrückung von entzündlichen Prozessen, Angio- und Tumorgenese spielt (Takada et al. 2007). IntegriSense™ 750 ist an ein Fluorochrom gekoppelt, dessen maximale Emission bei 775 nm nach einer Anregung bei 755 nm stattfindet, die maximale Absorption bei 748 nm (Abb. 6). Die Halbwertszeit im Gewebe beträgt ca. vier Tage.

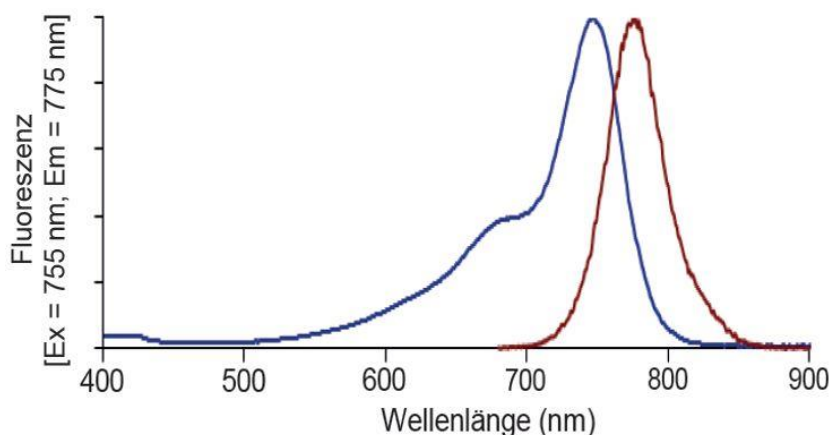


Abb. 6 : Absorptions- (blau) und Emissionsspektrum (rot) IntegriSense 750. Modifizierte Abbildung des Herstellers (Homepage: http://www.perkinelmer.de/lab-solutions/resources/docs/TCH_NEV10873-IntegriSense750-TD.pdf).

2.2.4. IRDye® 800CW Carboxylate

Beim NIR Farbstoff IRDye® 800CW Carboxylate handelt es sich um einen Heptamethincyaninfarbstoff, der in seiner aktiven Form als N-Hydroxysuccinimidester (NHS-Ester) zur funktionalen Kopplung an verschiedene Biomoleküle vorbereitet wurde. Da der Farbstoff in pharmazeutischer Qualität hergestellt wird, ist seine Anwendung in klinischen Studien möglich, wird allerdings derzeit noch nicht verfolgt. Als Kontrolle zu den im Anschluss beschriebenen funktionalisierten Varianten wurde die inaktive Form des Farbstoffs ohne den NHS-Ester verwendet. Das Absorptionsmaximum von IRDye® 800CW wird vom Hersteller mit 774 nm angegeben, das Emissionsmaximum mit 789 nm (Abb. 7).

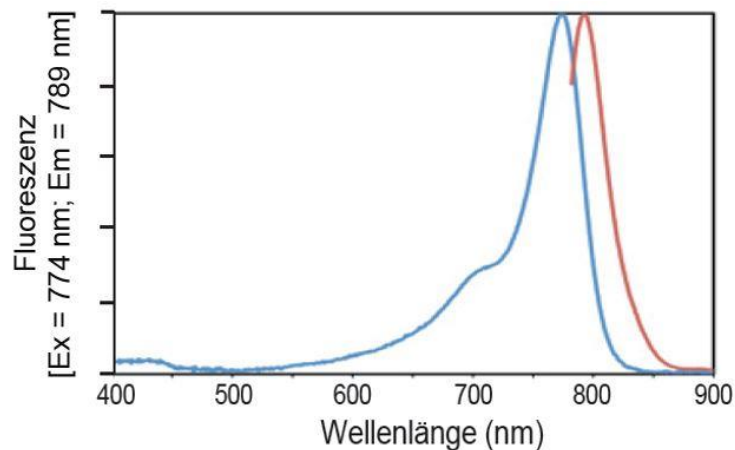


Abb. 7 : Absorptions- (blau) und Emissionsspektrum (rot) von IRDye 800 CW. Modifizierte Abbildung des Herstellers (Homepage: https://www.licor.com/bio/products/reagents/irdye/images/800cw_wavelength.jpg).

2.2.5. IRDye® 800CW EGF

In dieser funktionalisierten Variante wurde der oben beschriebene IRDye® an EGF gekoppelt. Im gesunden Organismus vermittelt EGF die Proliferation, Differenzierung und das Überleben von Zellen. Viele Tumore exprimieren vermehrt den zugehörigen epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor (*epidermal growth factor receptor*, EGFR) (Rowinsky 2004). Für die Fluoreszenzbildgebung kann diese erhöhte Expression ausgenutzt werden indem KM an EGF gekoppelt werden und somit am passenden Rezeptor binden. Die maximale Fluoreszenz und Absorption

entsprechen in etwa der des unkonjugierten IRDye 800CW als Carboxylat, die Wellenlängen sind nur um wenige Nanometer verschoben (Abb. 8).

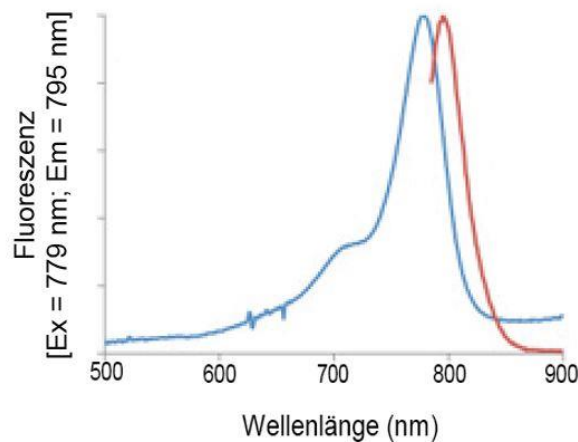


Abb. 8: Absorptions- (blau) und Emissionsspektrum (rot) des IRDye® 800CW EGF. Modifizierte Abbildung des Herstellers (Homepage: https://www.licor.com/bio/products/reagents/irdye/egf/800cw_specs.html)

2.2.6. IRDye® 800CW RGD

Beim IRDye® 800CW RGD wurde eine Erkennungssequenz für Integrinrezeptoren bestehend aus der Aminosäurefolge Arginin-Glycin-Asparaginsäure (Arg-Gly-Asp, RGD) an den Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt. Zustände einer veränderten Expression von Integrinrezeptoren, wie bereits unter 1.2.3. zum Beispiel für einige Tumoren beschrieben, können durch den IRDye® 800CW RGD dargestellt werden. Auch diese Farbstoffvariante zeigt im Vergleich zu den in den beiden vorigen Abschnitten beschriebenen leicht veränderte Maxima (Abb. 9).

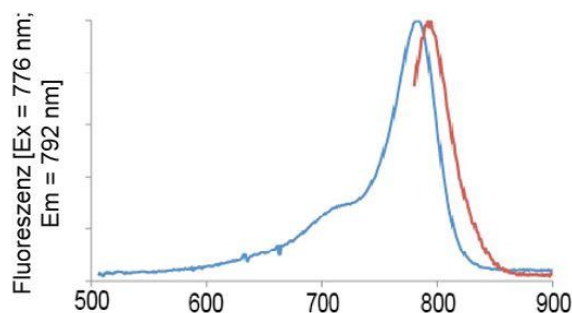


Abb. 9: Absorptions- (blau) und Emissionsspektrum (rot) IR Dye 800 RGD. Modifizierte Abbildung des Herstellers (Homepage: https://www.licor.com/bio/products/reagents/irdye/rgd/800cw_specs.html).

2.2.7. ICG-Pulsion®

Indocyaningrün (ICG) verfügt über ein breites Fluoreszenz- und Absorptionsspektrum. Bei dem klinischen Produkt ICG-Pulsion® wird das Absorptionsmaximum in Wasser mit 775 nm angegeben. Die Maxima für Exzitation und Emission werden mit 780 und 820 nm definiert. Die Fluoreszenzeigenschaften des ICG sind stark vom Medium und der Konzentration abhängig. Hierbei sind vielfältige Effekte zum Beispiel durch Agglomeration oder Bindung an Proteine beschrieben (Yuan et al. 2004; Mordon et al. 1998).

2.2.8. Methylenblau

Bei Methylenblau (3,7-Bis(dimethylamino)-phenothiaziniumchlorid) handelt es sich um ein Derivat des Phenothiazins. Klinisch findet es Anwendung als Antidot bei Nitrit- und Anilinvertgiftungen, wo es den beschleunigten Rückschritt von Methämoglobin zu funktionalem Hämoglobin bewirkt, aber auch gegen Psoriasis, Rheuma oder Malaria wird es eingesetzt. Eine noch größere Rolle spielt Methylenblau jedoch als Vitalfarbstoff in der histologischen Beurteilung von zellulärem Befall durch Mikroorganismen (Schirmer et al. 2011).

2.3. Herstellung Nanopartikel-basierter Kontrastmittel

2.3.1. Generelles Verfahren

Die Liposomen wurden aus einer Mischung verschiedener Lipide hergestellt, die aufgrund ihrer Membranbildungseigenschaften ausgewählt wurden und natürlich im Körper vorkommen. Alle verwendeten Lipide stammen von Avanti Polar Lipids, Inc., Alabaster, Alabama, USA und es wurden jeweils insgesamt 20 µM Lipide eingesetzt. Die Zusammensetzung dieser wird in den folgenden Kapiteln für jede Liposomenart beschrieben. Die Herstellung der verschiedenen Liposomen basiert auf demselben Verfahren, welches im Folgenden erklärt wird:

Zunächst wurden die jeweiligen Lipide mittels Hamilton®-Spritze in einem Rundbodenglas zusammen pipettiert. Das Lipidgemisch wurde unter Rotieren des Glases mit Stickstoffgas getrocknet, sodass ein gleichmäßiger Lipidfilm im Boden des Glases entstand und anschließend über Nacht lyophilisiert. Der vollständig trockene Lipidfilm wurde mit 850 µl DPBS (Dulbecco's *Phosphate-buffered saline*, GE Healthcare, PAA Laboratories GmbH, Pasching) und 150 µl ICG (ICG-Pulsion®, PULSION Medical Systems SE, Feldkirchen) für 30 Minuten bei 60 °C rehydriert. Die Lösung wurde im Anschluss drei Zyklen aus schnellem Einfrieren in flüssigem Stickstoff und Auftauen im Wasserbad bei 60 °C ausgesetzt, um die Inkorporation des KMs zu maximieren. Es folgte vier 15 Sekunden andauernde Ultraschall-Beschallungen bei niedrigstem Energielevel auf Eis um unilamellare Liposomen zu erhalten. Mittels einer PD-10 Einwegsäule zur Entsalzung (GE Healthcare GmbH, Solingen) wurden die Liposomen von den ungebundenen Resten getrennt. Die Säule war zuvor durch fünf Waschrötte mit jeweils 5 ml PBS vorbereitet worden.

2.3.2. Anionische Sphingomyelin Liposomen

Die anionischen Sphingomyelin Liposomen (SM Liposomen) wurden aus einer Mischung von Dipalmitoylphosphatidylcholin (DPPC), Cholesterin, N-(2,3-Dioleoyloxy-1-propyl)trimethylammoniummethyIsulfat (DOTAP) und Sphingomyelin in einem molaren Verhältnis von 20 : 30 : 30 : 20 mol % hergestellt. DPPC ist durch seine negative Ladung der Phosphatgruppe und seine positive Ladung der quartären Ammoniumgruppe ein Zwitterion neutraler Ladung, welches ein Hauptbestandteil von Lungensurfactant ist. Dabei senkt DPPC die Oberflächenspannung der Lungenalveolen (Goerke und Clements 2011). Cholesterin dient in dieser Formulierung einerseits der Erhöhung der Thermostabilität, gleichzeitig steigert es die Fluidität der Liposomenhülle. DOTAP, als kationisches Lipid, unterstützt die Ausbildung von Liposomen. Das Sphingomyelin, ein amphiphiles Phospholipid, wurde wegen seiner biologischen Funktion in die Liposomenmembran integriert.

2.3.3. Kationische Phosphatidylcholin Liposomen

Die kationischen Phosphatidylcholin Liposomen (PC Liposomen) wurden aus 1,2-Distearoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholin (DSPC) und Cholesterin in einem molaren Verhältnis von 70 : 30 mol % hergestellt. Dadurch erhielten sie auf der Oberfläche eine positive Ladung.

2.3.4. Thermosensitive Liposomen

Thermosensitive Liposomen (TS Liposomen) sind ein vielverfolgter Ansatz in der Tumorthherapie. Dabei sollen Liposomen zunächst an den Zielort gebracht werden und dort durch geringe Erhitzung des Gewebes (z.B. auf 39 - 42 °C) ihren Inhalt freisetzen (Deshpande et al. 2013; Kneidl et al. 2014). Die hier eingesetzten thermosensitiven Liposomen enthielten lediglich DSPC und DPPC in einem Verhältnis von 70 : 30 mol %. Es wurde auf DOTAP, Cholesterin und Sphingomyelin verzichtet. Dadurch entsteht eine deutlich instabilere Membran, die sich durch thermische Vorgänge desintegriert und durchlässig wird.

2.3.5. Liposomen mit Magnetpartikeln

Über eine Succinimidylester-Bindung können Moleküle auf die Oberfläche der Liposomen gebunden werden um ihnen eine neue Funktion zu geben. Dabei kann es sich um Antikörper oder Rezeptormoleküle handeln, die eine spezifische Bindung vermitteln. Ebenso können Fluorophore oder, wie hier beschrieben, Magnetpartikel oberflächlich immobilisiert werden. Kleine superparamagnetische Eisenoxidpartikel (*superparamagnetic iron oxide*, SPIO) dienen in der Klinik als MRT KM. Für die magnetischen Nanopartikel wurden nanomag®-CLD-sprio in 20 nm (Micromod 20 nm) und 100 nm (Micromod 100 nm) bereits mit Maleimid auf der Oberfläche erworben (micromod Partikeltechnologie GmbH, Rostock, Deutschland). Die Kopplung an die Liposomen erfolgte mittels Pierce™ Traut's Reagenz (2-Iminoethanol, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA), in welchem die Liposomen mit einem 10fachen Überschuss der Lösung eine Stunde

bei Raumtemperatur inkubiert wurden. Über eine bereits oben beschriebene, gewaschene Einwegsäule zur Entsalzung wurden die Liposomen anschließend vom Traut's Reagenz abgefiltert. Die Behandlung bewirkt, dass die Cysteinreste in der Lipidhülle des Liposoms thioliert werden. Dies ermöglicht die Ausbildung von Disulfidbrücken zwischen den Cysteinresten und dem Maleimid der Micromods. Hierfür wurden Liposomen und Micromods für drei Stunden bei Raumtemperatur unter Rühren gemeinsam inkubiert. Abschließend wurden die Liposomen erneut über eine Säule wie oben beschrieben isoliert und konzentriert. Die Liposomen waren weiterhin mit ICG befüllt, um eine Fluoreszenzbildgebung zu ermöglichen. Da Metalle eine sehr gute Wärmeleitfähigkeit besitzen und sich bei Photoneneinstrahlung stark erhitzen, sollte hier überprüft werden ob dies auch ein hohes photoakustisches Signal als Konsequenz hat.

2.4. Erstellung der Verdünnungsreihen

Von jedem KM wurden fünf Verdünnungsstufen gemessen. Die Verdünnungen wurden mit DPBS (GE Healthcare, PAA Laboratories GmbH, Pasching) angefertigt. Lediglich das ICG wurde mit destilliertem Wasser verdünnt, da es in DPBS ausfällt. Die Verdünnungen wurden seriell angefertigt. Zunächst wurde das jeweilige KM 1:1 verdünnt um die als "100 % Initialdosis-Lösung" ("100 %ID") definierte Konzentration zu erhalten. Diese Lösung wurde dann in zwei Schritten jeweils 1:10 weiter verdünnt, wodurch die Lösungen 10 % ID und 1 % ID entstanden. In einer zweiten Reihe wurde die 100 % ID Lösung zunächst 1:3 verdünnt (30 % ID) und anschließend 1:10 verdünnt (3 % ID). Das Verdünnungsschema kann Abbildung 10 entnommen werden.

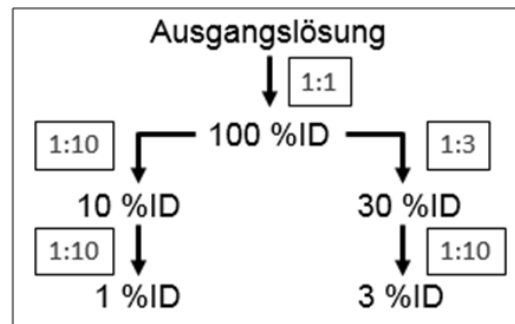


Abb. 10 : Verdünnungsschema für die Kontrastmittel. Die Kästen zeigen die Verdünnungsschritte, die prozentuale Initialdosis (% ID) besagt welcher Anteil der Ausgangslösung in der finalen Konzentration enthalten sind. Die Verdünnungen aller Kontrastmittel wurden mit DPBS angefertigt, mit Ausnahme von ICG, dort mit destilliertem Wasser.

2.5. Absorptionsmessung

Um zu überprüfen ob eine hohe Absorption auch ein hohes photoakustisches Signal zur Folge hat, wurden die etablierten PA KM Methylenblau und ICG im Tecan Infinite 200 (Tecan Trading AG, Männedorf, Schweiz) gemessen. Hierbei wurden die oben beschriebenen Verdünnungen verwendet und die Absorption über die bei der Photoakustikmessung verfügbaren Wellenlängen (680 – 970 nm) in 5 nm Schritten gemessen, sodass die Intervalle denen des photoakustischen Spektralscans entsprechen. Pro Wellenlänge wurden 20 Lichtblitze ohne Ruhezeit dazwischen gemessen. Bei zu hohen Absorptionswerten kann das Gerät keine Transillumination mehr feststellen. Hier wird kein numerischer Wert mehr angegeben, sondern lediglich die Übersättigung. Da dies bei den hohen Konzentrationen von Methylenblau und ICG teils der Fall war, konnten nicht alle Verdünnungsstufen in die Berechnung der Korrelation mit der PA einbezogen werden. Die Korrelation wurde mittels Spearman Rangkorrelation evaluiert.

2.6. Photoakustische Messung

2.6.1. Versuchsaufbau

Für die Messung wurde die Oberfläche der Schläuche zunächst gereinigt, um mögliche Staubanlagerungen oder sonstige Verunreinigungen zu entfernen. Anschließend wurden kurze Stücke des Schlauches in die Halterung eingeführt, mit ca. 5 - 10 μ l des jeweiligen KMs gefüllt und beidseitig mit etwas Knetsilikon verschlossen, um ein Austreten der Flüssigkeit und Eindringen umgebender Medien zu verhindern. Der mit bis zu sechs Schläuchen bestückte Halter wurde in einem Plastikgefäß positioniert, welches mit destilliertem Wasser gefüllt wurde bis die Schläuche gut bedeckt waren. Dabei musste darauf geachtet werden dass das Gefäß hoch genug war um ein vollständiges Einsinken des Schallkopfs mit seinen Sensoren zu erlauben. Unter dem Schallkopf befindliche Luftblasen wurden vorsichtig mit einer stumpfen Kanüle entfernt. Versuche die Messung in Ultraschallgel durchzuführen waren gescheitert, da sich hierin zu viele Lufteinschlüsse befanden, die die Ultraschallwellen absorbieren und somit eine Signalauslöschung bewirken. Für die Messung des materialspezifischen Störsignals wurden die Schläuche mit destilliertem Wasser befüllt, wobei auch hier Sorge getragen werden musste, dass keine Luftblasen erzeugt werden.

2.6.2. Photoakustik

Alle beschriebenen Photoakustik Messungen wurden am Vevo®2100 mit dem Vevo®LAZR (FUJIFILM VisualSonics, Inc., Toronto, Ontario, Kanada) durchgeführt. Der Laserschallkopf wurde in der dafür vorgesehenen Halterung in der metallenen Schutzummantelung (LAZRTight™ Imaging Station Enclosure, FUJIFILM VisualSonics, Inc., Toronto, Ontario, Kanada) angebracht (Abb. 11). Im B-Mode Ultraschall wurde der zu messende Bildbereich eingestellt, bevor die Schutzbox verschlossen wurde. Sensoren an den Türen der Ummantelung registrieren deren Öffnung, sodass erst bei völligem Verschluss ein aktivieren des Lasers möglich wird.

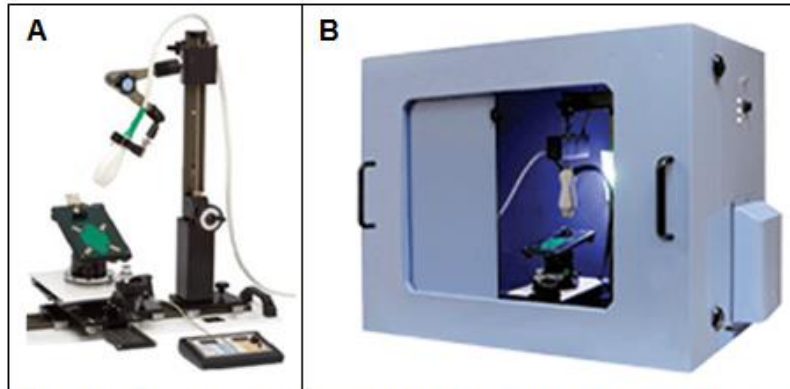


Abb. 11 : Vevo Imaging Station (links) und LAZRTight™ Imaging Station Enclosure (rechts). A: Halterung für Schallköpfe zur statischen Bildaufnahme; B: lichtdichte Ummantelung für die sichere Arbeit mit dem Stufe IV Laser des Vevo LAZR. Bild modifiziert nach Abbildung des Hersteller: www.visualsonics.com.

Vor der Messung wurde eine Aufwärmzeit des Lasers für mindestens 20 Minuten eingehalten. Weitere 20 Minuten wurde die *Flashlamp*, welche die Laserimpulse erzeugt, laufen gelassen. Beides diente der Garantie einer konstanten Anregungsenergie. Im Anschluss wurde der Energieausstoß des Lasers optimiert und mithilfe einer Sonde kalibriert. Während der Messungen erfolgte über den Vevo®LAZR ein konstantes Monitoring des Energielevels an der Spitze des fiberoptischen Bündels. Ein eingebauter Korrekturmechanismus, welcher die Energiedifferenzen der verschiedenen Wellenlängen kompensiert, wurde ebenfalls im Rahmen dieser Arbeit evaluiert. Dementsprechend wurde alle Messungen mit Korrekturalgorithmus („mit Korrektur“) und ohne entsprechende Korrektur („ohne Korrektur“) durchgeführt. Zudem wurde sowohl mit dem LZ250 (32 - 55 MHz) als auch mit dem LZ550 (13 - 24 MHz) gemessen. Die Spektralphotometrie wurde über die gesamte Bandbreite des Lasers von 680 – 970 nm in 5 nm Schritten bei einer Signalverstärkung von 40 Dezibel (dB) durchgeführt. Der Spektralscan wurde longitudinal jedes einzelnen Schlauchs angefertigt um somit die auszuwertende Fläche zu maximieren. Die gewonnen Bilddaten wurden zunächst mittels der zugehörigen Software (Vevo LAB 1.7, FUJIFILM VisualSonics, Inc., Toronto, Ontario, Kanada) ausgewertet. Um das in rot kodierte photoakustische Signal innerhalb des Phantomschlauchs wurde eine *region of interest* (ROI) gezogen und die gemittelte Intensität über den ausgewählten Bereich gegen die jeweilige Wellenlänge aufgetragen. Alle Messungen wurden einmal mit und einmal ohne den eingebauten Korrekturalgorithmus durchgeführt.

2.7. Statistische und graphische Auswertung

Alle gewonnenen Daten wurden aus Vevo LAB 1.7 exportiert und zunächst mithilfe von Windows Excel® (Microsoft® Corp., Redmond, WA, USA) in einer Tabelle zusammengefasst. Mit der Software Graph Pad PRISM (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA) erfolgte die statistische Auswertung sowie die Umsetzung in Graphen.

Zur statistischen Evaluierung des Korrekturalgorithmus und der Schallköpfe wurde eine lineare Regression durchgeführt und das 95 % Konfidenzintervall bestimmt. Als nicht-parametrischer Test zur Überprüfung der Korrelation zwischen Signalintensität und Absorption bzw. Signalintensität und KM Konzentration wurde der Spearman Rangkorrelationskoeffizient verwendet.

3. Ergebnisse

3.1. Entwicklung eines Phantoms für photoakustische Messungen

Bevor weitere Parameter überprüft wurden, sollte zunächst ein Phantom für eine standardisierte Vergleichsmessung in der PA entwickelt werden. Da das zunächst geplante Agarose-basierte Phantom bereits an der Befüllung mit einer definierten Menge an KM scheiterte und der Ansatz daher verworfen wurde, sind hierzu keine weiteren Ergebnisse aufgezeigt. Für ein Phantom basierend auf dünnen Plastikschläuchen wurden drei verschiedene Schlauchmaterialien evaluiert. Dafür wurden alle in eine eigens hierfür konstruierte Halterung eingelegt, die die Schläuche in der Waagerechten fixiert und in einem Wasserbad mittels Spektralscan gemessen. Jeweils fünf separate Messungen wurden gemittelt und die Standardabweichung bestimmt (Abb. 12).

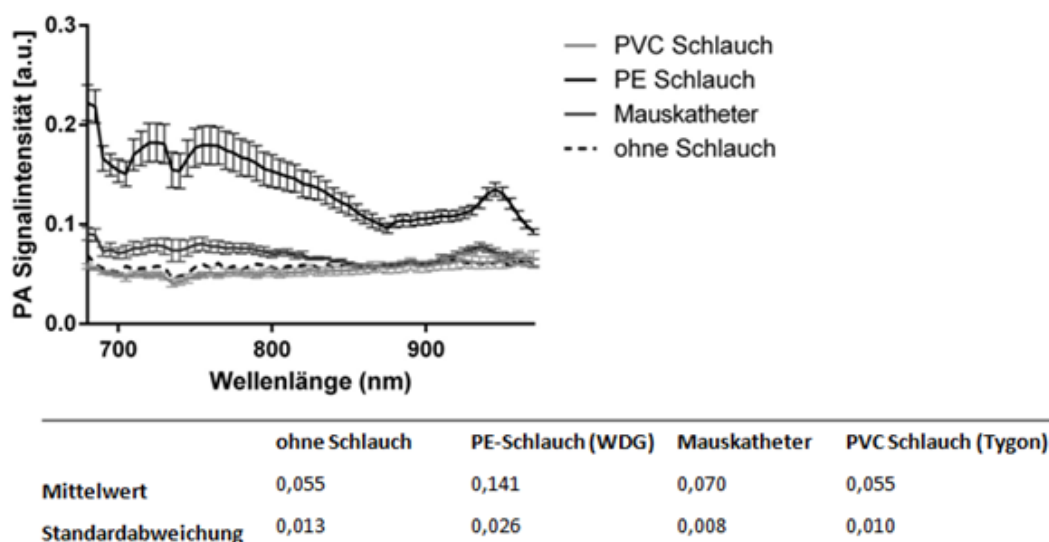


Abb. 12: Gemittelte photoakustische Spektralscans der verschiedenen Schlauchmaterialien im Phantom mit der Standardabweichung (jeweils $n = 5$). Schläuche wurden in eine Plexiglashalterung eingeführt und die photoakustische Signalintensität in destilliertem Wasser bei den Wellenlängen 680-970 nm gemessen.

Verglichen zum Hintergrundsignal das im Wasserbad ohne Schläuche gemessen wird, erzeugten sowohl der PE-Schlauch als auch der Mauskatheter deutliche

photoakustische Signale. Der PE-Schlauch zeigte insgesamt ein relativ hohes Signal, welches bei 680 nm Laserexzitation den Maximalwert erreichte und anschließend abfiel, bis sich bei etwa 725 nm ein weiterer Peak ausbildete. Ein Peak in vergleichbarer Höhe zeigte sich erneut bei ca. 755 nm. Anschließend fiel das photoakustische Signal ab, bis es bei etwa 880 nm sein Minimum erreichte und stieg dann langsam zu einem letzten klaren Peak bei ca. 950 nm. Insgesamt bildete sich beim PE-Schlauch ein Mittelwert von $0,141 \pm 0,026$ Intensitätseinheiten, verglichen zu dem Hintergrundsignal des Wassers von $0,055 \pm 0,013$ Intensitätseinheiten. Das photoakustische Hintergrundsignal des Mauskatheters lag mit einer mittleren Signalintensität von $0,070 \pm 0,008$ Intensitätseinheiten deutlich unter dem des PE-Schlauchs. Im Verlauf ähnelten sich beide Kurven, die Peaks bildeten sich bei den gleichen Wellenlängen aus, waren jedoch beim Katheter weniger stark ausgeprägt. Anders als beim PE-Schlauch reichte der letzte Peak bei ca. 950 nm beim Mauskatheter allerdings an die Intensitäten der beiden vorherigen Peaks heran. Der PVC-Schlauch lag mit einem mittleren photoakustischen Signal von $0,055 \pm 0,010$ Intensitätseinheiten beim selben Mittelwert mit einer geringeren Standardabweichung im Vergleich zum umgebenden Wasser. Die Verläufe der Spektren ähnelten sich ebenfalls, es zeigten sich keine deutlichen Peaks sondern lediglich leichte Schwankungen um den Mittelwert. Die Peaks bei ca. 725 und 755 nm bilden minimal die Peaks der anderen Kurven ab, jedoch mehr durch die Ausbildung einer Depression bei ca. 740 nm.

3.2. Evaluierung des Systems mittels etablierter Photoakustik-Kontrastmittel

Für die Evaluation der zwei verschiedenen Laserschallköpfe (LZ250 und LZ550), des optional verwendbaren Korrekturalgorithmus, sowie als Vergleichswert für die spätere Beurteilung der neuen KM wurden zunächst Spektralscans mit Verdünnungen von Methylenblau und ICG durchgeführt. Die Verdünnungen wurden jeweils mit beiden Schallköpfen und jeweils mit aktiviertem beziehungsweise deaktiviertem Korrekturalgorithmus gemessen. Fiel ein Signal so niedrig aus, dass es an der Nachweisgrenze lag, wurden keine niedrigeren Konzentrationen mehr

gemessen. Zudem wurde als Grundlage zur späteren Bewertung der weiteren KM überprüft, ob ein Zusammenhang zwischen Absorption und Intensität des photoakustischen Signals besteht.

3.2.1. Evaluierung des Korrekturalgorithmus und der Schallköpfe

Abbildung 13 zeigt die über das Spektrum des Lasers gemessenen Signalintensitäten mit und ohne Anwendung des Korrekturalgorithmus. Für den Vergleich wird zunächst der Kurvenverlauf der höchsten Konzentration beider KM beschrieben.

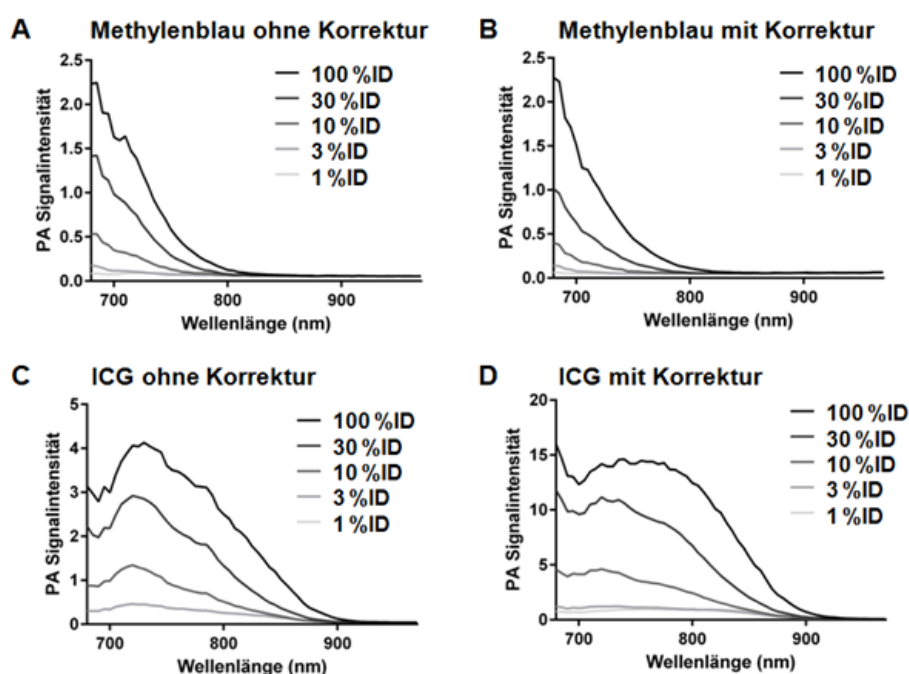


Abb. 13 : Photoakustik Spektral-scans von Methylenblau (A,B) und ICG (C,D) mit und ohne Korrekturalgorithmus. Phantommessung der photoakustischen Signalintensität der unverdünnten Kontrastmittel im PVC-Schlauch in destilliertem Wasser über die Wellenlängen 680–970nm; A: Methylenblau ohne Korrektur; B: Methylenblau mit Korrektur; C: ICG ohne Korrektur; D: ICG mit Korrektur.

Methylenblau (Abb.13, A und B) erzeugte im Phantom ein deutlich erkennbares Signal, welches im ROI unverdünnt eine maximale Signalintensität von etwa 2,3 relativen Einheiten zeigte. Dabei lag das Maximum bei 680 nm. Mit höheren Laserwellenlängen nahm die photoakustische Signalintensität ab. Mit dem Korrekturalgorithmus zeigte sich insgesamt ein homogenerer Kurvenverlauf mit

einem konstanten Signalabfall nach dem Maximum und lediglich einer kleinen Schulter bei ca. 720 nm und einer noch schwächeren bei 700 nm. Ohne Korrektur bildete die Kurve bei 700 nm eine spitz verlaufende Schulter und bei 720 nm einen kleinen Peak aus.

ICG (Abb. 13, C und D) erreichte mit Korrektur ebenfalls bei 680 nm die maximale Signalintensität, diese lag jedoch mit knapp 16 relativen Einheiten weit über der des Methylenblaus. Insgesamt beschreibt das ICG-Signal mit aktivierter Korrektur, nach einem kurzen Abfall zwischen 680 und 700 nm, eine Kurve mit einem breiten Peak, der bei etwa 740 nm sein Maximum erreicht. Nach 800 nm fällt die Kurve stetig ab und verläuft nach etwa 900 nm asymptotisch zur x-Achse. Ohne den Korrekturalgorithmus verläuft die Kurve prägnanter, mit einem deutlichen Peak bei etwa 720 nm. Somit verändert sich das Maximum nicht mit dem Algorithmus, jedoch liegt insgesamt die Intensität um ein Vielfaches niedriger. Auch nach dem vergleichsweise schmalen Peak fällt die Signalintensität des ICG gemessen ohne Korrektur nach einer kleinen Schulter bei 800 nm, analog zu den korrigierten Werten, stetig ab.

Zur Evaluation der Datenqualität der beiden Schallköpfe LZ250 und LZ550 wurden alle KM und ihre Verdünnungen mit beiden gemessen. Mittels einer linearen Regression wurde überprüft, wie gut die Signalintensität mit den Konzentrationen des KMs korreliert. Abbildung 14 zeigt die lineare Regression der erhaltenen Messwerte jeweils mit eingeschaltetem Korrekturmechanismus exemplarisch für einzelne kommerzielle Farbstoffe und Liposomen. Das Bestimmtheitsmaß (R^2) und der Signifikanzwert (p-Wert) der Messungen aller untersuchten Stoffe mit und ohne Korrekturalgorithmus kann Tabelle 2 entnommen werden.

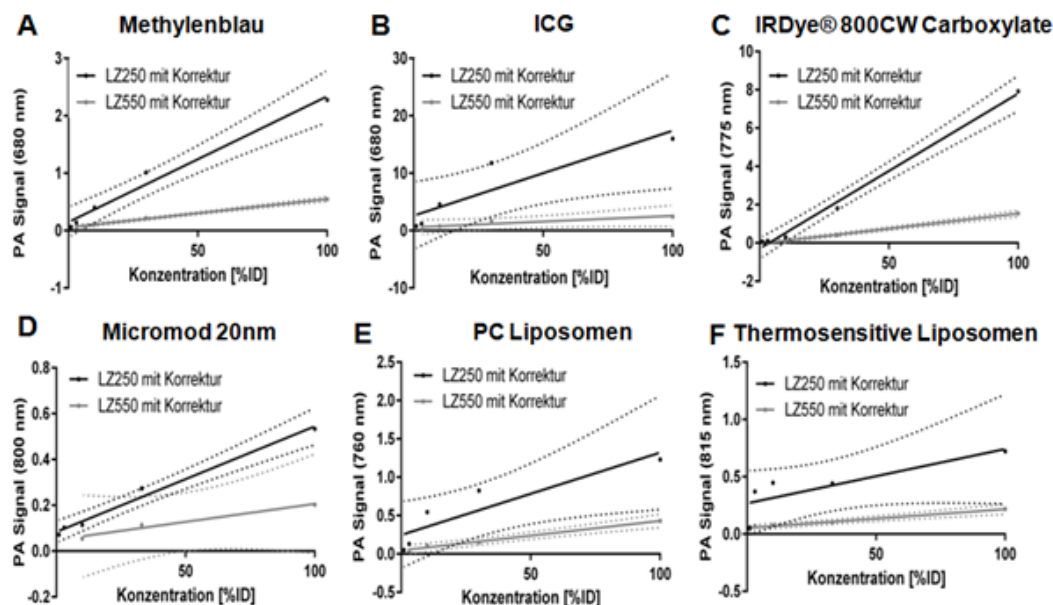


Abb. 14 : Photoakustik Spektalscans verschiedener Kontrastmittel mit dem LZ250- (schwarz) und LZ550-Schallkopf (grau). Photoakustische Signalintensität verschiedener Verdünnungen bei der Wellenlänge des maximalen Signals des jeweiligen Kontrastmittels mit dem 95% Konfidenzintervall. A: Methylenblau gemessen bei 680 nm; B: ICG gemessen bei 680 nm; C: IRDye® 800CW Carboxylate gemessen bei 775 nm; D: Liposomen mit Micromod 20 nm gemessen bei 800 nm; E: PC Liposomen gemessen bei 760 nm; F: Thermosensitive Liposomen gemessen bei 815 nm.

Tab. 2: Lineare Korrelation der Konzentration des Kontrastmittels mit der photoakustischen Signalintensität bei der Wellenlänge des Hauptpeaks. Zellen ohne Angabe (k. A.) kennzeichnen einen zu geringen Messwert, sodass hier keine Korrelation berechnet werden konnte.

Kontrastmittel (Handelsname)	LZ250		LZ550	
	mit Korrektur R ² (p-Wert)	ohne Korrektur R ² (p-Wert)	mit Korrektur R ² (p-Wert)	ohne Korrektur R ² (p-Wert)
Methylenblau	0,9807 (0,0011)	0,8952 (0,0149)	0,9986 (0,0007)	0,9791 (0,0105)
ICG	0,8246 (0,0330)	0,8272 (0,0322)	0,8557 (0,0749)	0,8359 (0,0875)
IRDye® 800CW Carboxylate	0,9940 (0,0002)	0,9818 (0,0011)	0,9979 (0,0011)	0,9934 (0,0033)
IRDye® 800CW EGF	0,8708 (0,04510)	0,9879 (0,01009)	k.A.	k.A.
PC Liposomen	0,8191 (0,0346)	0,8913 (0,0157)	0,9903 (0,0049)	0,1362 (0,0739)
SM Liposomen	0,9890 (0,0055)	0,9845 (0,0078)	k.A.	k.A.
TS Liposomen	0,6774 (0,087)	0,7332 (0,0640)	0,9668 (0,0026)	0,9538 (0,0043)
Micromod 20nm	0,9859 (0,0007)	0,9838 (0,0009)	0,9726 (0,1059)	0,9866 (0,0739)
Micromod 100nm	0,9915 (0,0003)	0,9315 (0,0009)	0,9998 (0,0083)	0,9999 (0,0033)

Insgesamt liegt die vom LZ250 gemessene Signalintensität über der des LZ550. Das 95 % Konfidenzintervall bildet sich bei den meisten KM für beide Schallköpfe relativ schmal ab. Beim LZ250 zeigen lediglich ICG und die nicht-konjugierten

Liposomen eine weitere Streuung der Daten. Mit dem LZ550 ergab sich bei den mit 20 nm Durchmesser SPIOs beladenen Liposomen ein breiteres Konfidenzintervall (Abb. 14D). Vergleicht man das Bestimmtheitsmaß aller untersuchten KM zeigt sich, dass mit Korrektur meist stärkere lineare Zusammenhänge bestanden, ausgedrückt durch ein höheres R^2 und einen niedrigen zugehörigen p-Wert. Ausnahmen hierzu ergaben sich für ICG und Sphingomyelin Liposomen, wo bei der Messung mit dem LZ250 vergleichbare Korrelationen mit und ohne Korrektur errechnet wurden. Bei den Phosphatidylcholin und thermosensitiven Liposomen ergab sich beim LZ250 eine stärkere Korrelation zur Konzentration ohne den Korrekturalgorithmus. Beim LZ550 war dies ebenso bei den Micromod-beladenen Liposomen beider Durchmesser, wobei bei den 20 nm SPIOs kein Signifikanzlevel erreicht wurde. Vergleicht man die Messergebnisse beider Schallköpfe, konnte mit dem LZ250 nur in einem Fall (TS Liposomen) keine signifikante Korrelation der Signalintensitäten zur Konzentration des KMs nachgewiesen werden, wohingegen der LZ550 bei ICG, Micromod 20 nm Liposomen und bei den Phosphatidylcholin Liposomen (hier nur ohne Korrektur) keine signifikant korrelierenden Intensitäten maß. Als weiteres Maß für die Eignung der Laserschallköpfe wurde die Sensitivität der gemessenen Signalintensität bewertet, indem verglichen wurde bis zu welcher Verdünnungsstufe das photoakustische Signal über den Hintergrund des Schlauchphantoms nachweisbar blieb. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3 dargestellt.

Tab. 3: Nachweisgrenze des photoakustischen Signals der Verdünnungen verschiedener Kontrastmittel im Vergleich der Laserschallköpfe LZ250 und LZ550.

Nachweisgrenze [% ID]	Schallkopf	ICG-Pulsion	Methylenblau	Alexa Fluor® 488	Genhance™ 680	IntegriSense™ 750	IRDye® 800CW Carboxylate	IRDye® 800CW EGF	IRDye® 800CW RGD	SM Liposomen	PC Liposomen	TS Liposomen	Micromod 20nm	Micromod 100nm
	LZ250	1	1	> 100	10	3	>1	>1	30	3	1	< 1	< 1	< 1
	LZ550	1	3	> 100	> 100	100	3	> 100	> 100	100	3	< 1	10	10

Hierbei zeigte sich, dass die mit dem LZ250 gemessenen Signalintensitäten über denen des LZ550 lagen, sodass alle untersuchten KM auch in niedrigeren Konzentrationen noch Signal über der Nachweisgrenze erzeugten. Lediglich bei ICG und den thermosensitiven Liposomen konnte der LZ550 ebenfalls bis zur höchsten Verdünnungsstufe noch Signalintensitäten über der Nachweisgrenze messen, wobei das Intensitätsniveau auch hier unter dem des mit dem LZ250 bestimmten lag.

3.2.2. Zusammenhang zwischen Absorption und photoakustischer Signalintensität

Die Messung der Absorption ergab für Methylenblau bei allen Konzentrationen vergleichbare Kurvenverläufe (Abb. 15). Bei niedrigen Wellenlängen absorbierte Methylenblau die meisten Photonen. Mit zunehmenden Wellenlängen nahm die Absorption ab, bis sie bei etwa 750 bis 800 nm einen Plateauwert erreichte, welcher bis zum Ende der Messung stagnierte. Lediglich in der höchsten Verdünnung (1 % ID, Abb. 15C) schwankten die Absorptionswerte im hohen Wellenlängenbereich leicht und nahmen ab etwa 900 nm wieder minimal zu.

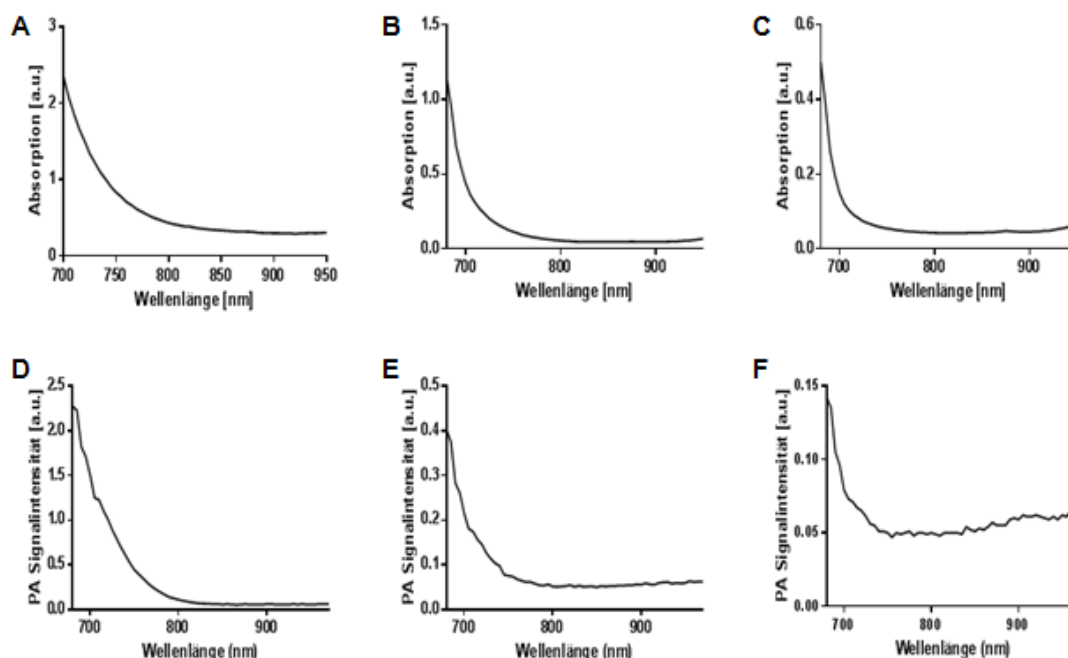


Abb. 15: Absorption (A-C) und photoakustische Signalintensität (D-F) von Methylenblau in drei repräsentativen Konzentrationen. A - C: Absorption Methylenblau bei (A) 10 % ID, (B) 3 % ID, (C) 1 % ID; D - F: photoakustische Signalintensität Methylenblau bei (D) 0 % ID, (E) 3 % ID, (F) 1 % ID. Alle Messungen im Schlauchphantom in destilliertem Wasser.

Bei ICG konnten erst ab 10 % der Ausgangskonzentration valide Absorptionsdaten gewonnen werden, da höhere Konzentration außerhalb des oberen Messbereichs des verwendeten Messgeräts lagen (Abb. 16).

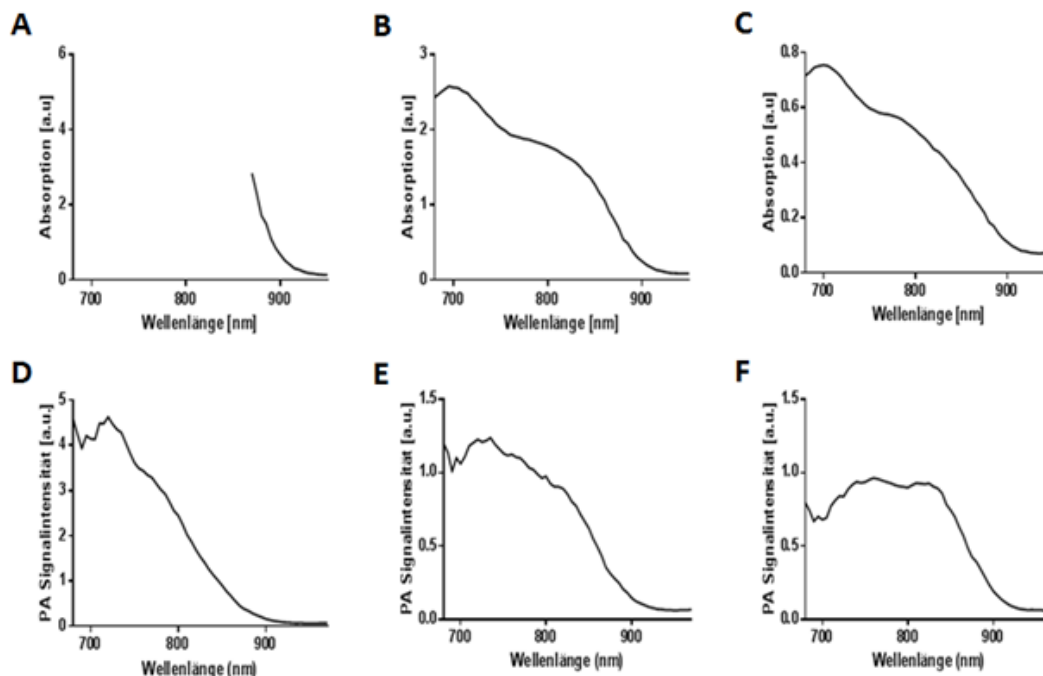


Abb. 16 : Absorption (A-C) und photoakustische Signalintensität (D-F) von ICG in drei repräsentativen Konzentrationen. A - C: Absorption ICG bei (A) 10% ID, (B) 3% ID, (C) 1% ID; D - F: photoakustische Signalintensität ICG bei (D) 0 % ID, (E) 3 % ID, (F) 1 % ID. Alle Messungen im Schlauchphantom in destilliertem Wasser.

Auch bei 10% ID lag die Absorption zwischen 680 und 870 nm noch zu hoch, um messbare Photonen zum Sensor durchzulassen, daher zeigt Abbildung 16A lediglich den Bereich der höheren Wellenlängen. In diesem Bereich nimmt die Absorption von ICG ab bis sie bei etwa 920 nm in ein Plateau übergeht. Dieser Verlauf ist auch in den Kurven der niedrigeren Konzentrationen nachvollziehbar. Zuvor bildet die Kurve jeweils bei etwa 700 nm einen Peak aus. Zwischen 750 und 800 nm bildet sich erneut eine Schulter nach welcher die Absorption abfällt bis zum oben beschriebenen Plateau.

Die Ergebnisse des mathematischen Vergleichs der Absorption von Methylenblau und ICG mit der photoakustischen Signalintensität sind in Tabelle 4 zusammengefasst. Je höher die Konzentration des KMs ist, desto höher ist auch die Korrelation bestimmt durch den Spearman Rangkorrelationskoeffizient. Der p-Wert zeigt, dass es sich unabhängig von dem Ausmaß bei allen festgestellten Korrelationen um hochsignifikante Abhängigkeiten handelt.

Tab. 4: Korrelation der Absorption mit der photoakustischen Signalintensität bestimmt durch die Rangkorrelation nach Spearman.

Kontrastmittel	Korrelation mit Absorption	Konzentration				
		100 % ID	30 % ID	10 % ID	3 % ID	1 % ID
Methylenblau	Spearman r	0,9183	0,8322	0,8604	0,7071	0,4831
	p -Wert	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	0,0002
ICG-Pulsion	Spearman r	-	-	0,9933	0,9499	0,6443
	p-Wert	-	-	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001

3.3. Evaluierung der kommerziellen Fluoreszenzfarbstoffe und Nanopartikel

Die Evaluierung der in dieser Arbeit untersuchten KM erfolgte anhand der Messung der photoakustischen Signalintensität verschiedener Konzentrationen über alle verfügbaren Wellenlängen. In die Bewertung wurden, wie unter 3.2. ausgeführt, die Messungen mit dem LZ250 und aktiviertem Korrekturalgorithmus einbezogen. Erreichte eine Konzentration nicht mehr die Nachweisgrenze von etwa 0,05 – 0,06 Intensitätseinheiten, wurden keine weiteren Verdünnungen gemessen.

3.3.1. Kommerzielle Fluoreszenzfarbstoffe

Die photoakustischen Spektren der einzelnen kommerziell erhältlichen

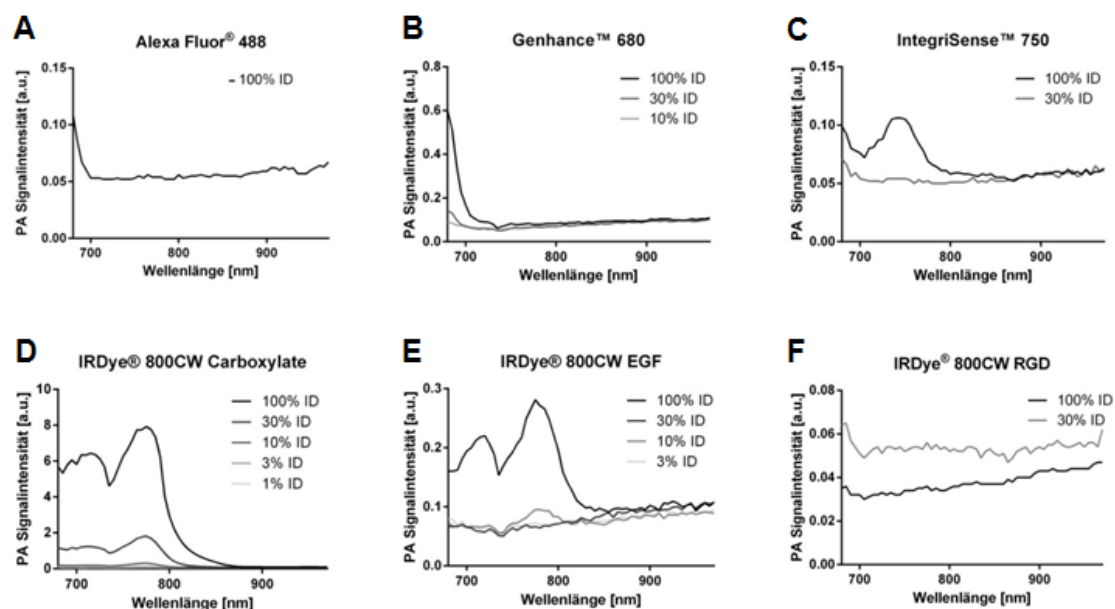


Abb. 17 : Photoakustische Spektral-scans der untersuchten Fluoreszenzfarbstoffe aller gemessenen Konzentrationen. Messung der Konzentrationen 1-100% der Initialdosis bei den Wellenlängen 680-970 nm im Schlauchphantom in destilliertem Wasser; A: Alexa Fluor® 788; B: Genhance™ 680; C: IntegriSense™ 750; D: IRDye® 800CW Carboxylate; ; E: IRDye® 800CW EGF; F: IRDye® 800CW RGD.

Fluoreszenzfarbstoffe sind in Abbildung 17 dargestellt.

Alexa Fluor® 488 (Abb. 17A) zeigt bei der Anfangswellenlänge von 680 nm mit 0,109 a.u. die höchste Signalintensität, die zunächst abfällt und dann bei ungefähr 700 nm in ein Plateau von etwa 0,052 Intensitätseinheiten übergeht. Über 900 nm steigt die PA Intensität wieder leicht an, vor allem zwischen 960 und 970 nm.

Genhance™ 680 (Abb. 17B) demonstriert ein ähnliches Spektrum wie Alexa Fluor® 488. Auch hier wird das Intensitätsmaximum von 0,601 Einheiten direkt bei 680 nm erreicht, anschließend fällt die Kurve steil ab und geht bei etwa 700 nm in ein bis zur höchsten Wellenlänge langsam ansteigendes Plateau von etwas über 0,01 Intensitätseinheiten über. Mit 30 % der Ausgangskonzentration liegt das Gesamtsignal nur noch knapp über der Nachweisgrenze, bleibt im Verlauf aber identisch. Die Messwerte der nächsten Verdünnungsstufe befinden sich unterhalb der Nachweisgrenze und der Peak zeichnet sich nur noch sehr schwach ab.

Das Spektrum von IntegriSense™ 750 (Abb. 17C) bildet bei 740 nm einen deutlichen Peak aus, der 0,106 Intensitätseinheiten erreicht. Danach verläuft die Intensität in einem Plateau von etwa 0,07. Zu Beginn erreicht die Intensität annähernd den Maximalwert, fällt aber zu 700 nm ab. In der ersten Verdünnungsstufe ist der Peak bereits nicht mehr abgrenzbar, insgesamt ist die Signalintensität an der Nachweisschwelle.

Die Carboxylvariante des IRDye®800CW (Abb. 17D) zeigt im photoakustischen Spektrum zwei Peaks. Der erste, niedrigere Peak liegt bei ca. 710 nm, der Hauptpeak bei 775 nm. Die Signalintensität liegt mit einem Maximum von etwa 8 Signaleinheiten im Vergleich zu den weiteren KM sehr hoch. Nach dem zweiten Peak fällt das Signal schnell ab und verläuft asymptotisch zur x-Achse. Das photoakustische Signal aller Verdünnungsstufen liegt über dem Hintergrundsignal des Phantoms. Der deutliche Peak bei 775 nm zeichnet sich bei allen Konzentrationen außer 1 % ID, wo er nur noch eine flache Erhebung bildet, ab.

Gekoppelt mit EGF liegt das photoakustische Signal des IRDye®800CW bei weitaus geringeren Intensitäten und erreicht maximal nur knapp 0,3 Einheiten (Abb. 17E). Die Peaks und der generelle Verlauf des Spektrums entsprechen dem des carboxylierten Pendants, bei Wellenlängen über 810 nm stagniert die Signalintensität jedoch bis zum Ende der Messung. Bei 10 und 3 % der Initialdosis sind die Peaks nicht mehr abgrenzbar und die Intensität steigt nach einem Minimum bei etwa 745 nm bis zum Ende der Messung stetig. Im langen Wellenlängenbereich liegen alle Konzentrationen in einem vergleichbaren Bereich.

Der IRDye®800CW RGD (Abb. 17F) erzeugt ein photoakustisches Spektrum von sehr geringer Intensität, welches schon in der höchsten Konzentration kaum den Hintergrundschwellwert übersteigt. Die Kurve steigt stufenweise an, der Verlauf unterliegt vielen Schwankungen. Bei 970 nm liegt das maximale photoakustische Signal bei knapp 0,05 Intensitätseinheiten. Bei 30 % ID erreicht das photoakustische Signal nicht mehr die festgesetzte Nachweisgrenze von 0,05 Signaleinheiten. Die Signalintensität verändert sich kaum über die Wellenlängen, sodass auch keine Peaks mehr identifiziert werden können.

3.3.2. Nanopartikel-basierte Kontrastmittel

Die Ergebnisse der Spektralscans der höchsten Konzentrationen der verschiedenen Liposomen sind in Abbildung 18 gezeigt.

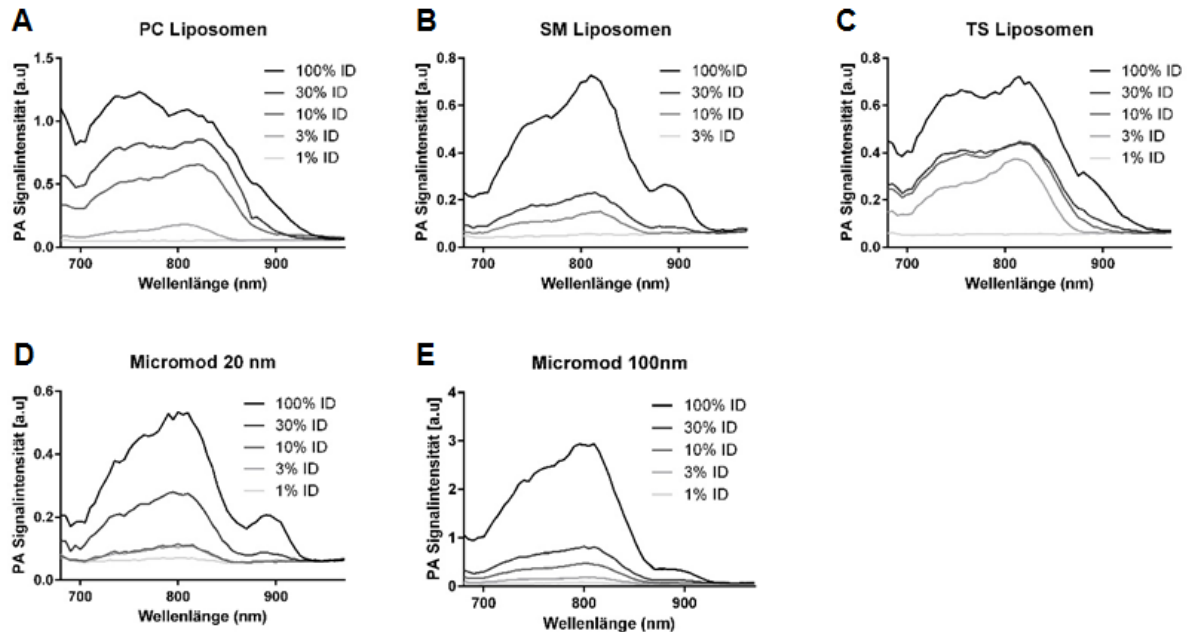


Abb. 18: Photoakustische Spektralscans der untersuchten Nanopartikel aller gemessenen Konzentrationen. Messung der Konzentrationen 1-100% der Initialdosis bei den Wellenlängen 680-970 nm im Schlauchphantom in destilliertem Wasser. A: PC Liposomen; B: SM Liposomen; C: TS Liposomen; D: Liposomen mit Micromod 20 nm SPIOs; E: Liposomen mit Micromod 100 nm SPIOs.

Die PC Liposomen (Abb. 18A) bilden einen breiten Peak. Nach 680 nm fällt die Intensität zunächst ab, nach einem Tiefpunkt bei 700 nm steigt die Kurve zu einem ersten, breiten Peak bei etwa 760 nm. Bei ca. 805 nm bildet sich ein zweiter Peak als Schulter des ersten aus, bevor die Kurve Richtung 970 nm abfällt. Dabei zeigt sich noch einmal eine kleine Schulter bei ca. 890 nm. Dieser Verlauf zeigt sich bis zu 3 % der Initialdosis, wobei sich ab 10 % ID die letzte Schulter nicht mehr ausbildet. Die Gesamtintensität verringert sich mit jeder Verdünnung und die Peaks flachen ab.

Die SM Liposomen (Abb. 18B) beginnen mit einer niedrigen Signalintensität bis die Kurve bei ca. 705 nm steil ansteigt und bei etwa 750 nm eine Schulter bildet. Der Hauptpeak findet sich dann bei 810 nm, im Anschluss fällt das Signal stark ab und erreicht bei ca. 880 nm das Ausgangsniveau. Zwischen 880 nm und 900 nm bildet sich ein kleiner Peak nach welchem die Kurve über den Ausgangswert hinaus abfällt und ab ca. 910 nm in einem Plateau ausläuft. Bei 30 % ID sind die Peaks bereits sehr abgeflacht, jedoch noch erkennbar und auch bei 10 % ID lassen sie sich noch

erahnen. Vor allem der Hauptpeak bei 810 nm bleibt erkenntlich, erst ab 3 % ID bildet sich nur noch eine flache, langstreckige Erhebung.

Der Spektralscan der TS Liposomen (Abb. 18C) ähnelt dem der PC Liposomen. Unterschiede sind hier, dass die Signalintensität des zweiten Peaks (der Schulter) über dem des ersten liegt und dass die Intensität insgesamt nur ungefähr halb so hoch liegt. Des Weiteren bleibt die Intensität höher, sodass sich die Kurven von 30 und 10 % ID annähernd decken. Auch 10 % ID zeigt noch ein prägnantes Spektrum mit dem ausgeprägten Hauptpeak bei 815 nm. Bei 1 % der Ausgangskonzentration stagniert die Intensität auf einem sehr niedrigen Niveau.

Die mit den SPIOs gekoppelten Liposomen bilden Kurvenverläufe, welche mit den SM Liposomen vergleichbar sind. Bei den 20 nm Micromod Liposomen (Abb. 18D) liegt der Hauptpeak des photoakustischen Signals bei 800 nm, bei ca. 890 nm bildet sich der zweite, deutlich niedrigere Peak. Bei 30 % ID halbiert sich die Signalintensität, der hintere Peak bei ca. 880 nm ist nur noch schwach ausgeprägt, bei 10 % ID ist er nicht mehr erkennbar. Die niedrigste Verdünnung zeigt keine klaren Erhebungen mehr.

Die 100 nm Micromod Liposomen (Abb. 18E) bilden ein vier- bis fünffach höheres photoakustisches Signal als die 20 nm Micromod Liposomen. Insgesamt verläuft das Spektrum der 100 nm Micromod Liposomen glatter, die erste Schulter ist kaum vom Hauptpeak bei 810 nm abzugrenzen und auch der letzte Peak vor 900 nm ist kaum ausgeprägt. Bereits die erste Verdünnung (30 % ID) zeigt eine sechsfach verringerte Signalintensität des Peaks. Mit den weiteren Verdünnungen wird die Signalintensität kleiner, der Hauptpeak flacht ab und ist nicht mehr klar erkennbar.

3.3.3. Vergleich aller Parameter und Kontrastmittel

Zum Vergleich aller untersuchten KM wurden die hier ermittelten Parameter für alle KM (Abb. 19) und die gegebenen Herstellerinformationen zusammengefasst (Tab. 5).

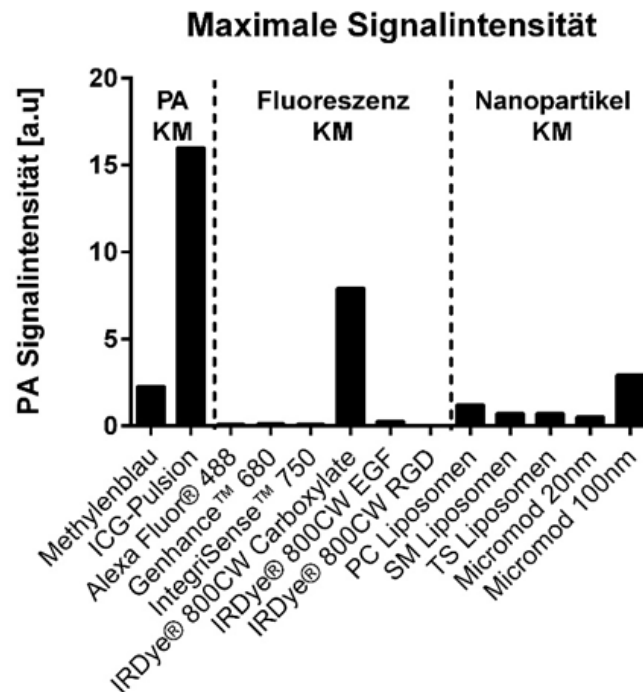


Abb. 19: Vergleich der maximalen photoakustischen Signale der höchsten Konzentration aller Kontrastmittel. Gezeigtes Maximum entspricht der über alle Wellenlängen hinweg gemessenen höchsten photoakustischen Signalintensität, welche bei den Spektralscans der Initialdosis im Schlauchphantom in destilliertem Wasser ermittelt wurde.

Bei annähernd allen Fluoreszenzfarbstoffen deckt sich die für das Absorptionsmaximum angegebene Wellenlänge gut mit der für das photoakustische Intensitätsmaximum ermittelten. Bei Alexa Fluor® 488 liegt das photoakustische Maximum mit der niedrigsten vom Laser erzeugbaren Wellenlänge (680 nm) längerwellig als bei der Absorption. Die Wellenlängen der beiden Maxima weichen bei IRDye®800CW RGD mit ca. 200 nm am weitesten innerhalb der Messspanne auseinander. Die durch die Fluoreszenzfarbstoffe in der PA erreichten Signalintensitäten variieren sehr stark, bleiben aber überwiegend mit unter 0,3 Intensitätseinheiten niedrig im Vergleich zu den etablierten PA KM. Lediglich IRDye®800CW Carboxylate erreicht mit 7,9 Intensitätseinheiten ein Signal, welches höher als das des Methyleneblaus ausfällt.

Die Nanopartikel erreichen ihr photoakustisches Maximum alle im Bereich, beziehungsweise im Fall der PC Liposomen exakt bei, der Wellenlänge des Absorptionsmaximums des ICG von 800 nm. Mit 40 nm Differenz liegt einzig das photoakustische Maximum der PC Liposomen in den kurzwelligeren Bereich verschoben, die weiteren Maxima finden sich 10 bis 15 nm im längerwelligen Bereich. Die Signalintensitäten sind höher als die der Fluoreszenzfarbstoffe, aber mit Ausnahme der Micromod 100 nm Liposomen unter denen des Methylenblaus.

Tab. 5: Übersicht über alle Kontrastmittel mit Herstellerangaben zu Ausgangskonzentration und Absorptionsmaximum sowie ermittelte Wellenlänge und Intensität des maximalen photoakustischen Signals.

	Kontrastmittel Handelsname	Ausgangs- konzentration	Max Absorption [nm]	PA Max Wellen- länge [nm]	PA Max Intensität
PA-Kontrastmittel	Methylenblau	5 mg/ml	660	680	2,277
	ICG-Pulsion	5 mg/ml	800	680	16,016
Kommerzielle Fluoreszenzfarbstoffe	Alexa Fluor 488	1 mg/ml	495	680	0,109
	Genhance 680	0,5 mg/ml	670	680	0,601
	IntegriSense 750	20 nmol/ml	748	740, 745	0,106
	IRDye 800CW Carboxylate	5 mg/ml	774	775	7,923
	IRDye 800CW EGF	13,3 nmol/ml	779	775	0,281
	IRDye 800CW RGD	10 nmol/ml	776	965, 970	0,047
Nanopartikel Kontrastmittel	Micromod 100nm SPIO	0,33 mg/ml	800	810	2,941
	Micromod 20nm SPIO	0,33 mg/ml	800	800	0,534
	PC Liposomen mit ICG	0,33 mg/ml	800	760	1,232
	SM Liposomen mit ICG	0,33 mg/ml	800	810	0,728
	TS Liposomen mit ICG	0,33 mg/ml	800	815	0,723

4. Diskussion

4.1. Entwicklung eines Phantoms für photoakustische Messungen

Die Entwicklung eines Phantoms für die reproduzierbare Charakterisierung von Kontrastmitteln gehört zu den notwendigen Grundlagen jeder bildgebenden Technik. Phantome haben generell die Aufgabe eine standardisierte Umgebung für die Messung von Signalen zu schaffen die teils auch Gewebe simulieren soll. Dabei wurden Phantome dieser Art bereits 1978 für den Einsatz im Ultraschall beschrieben (Madsen et al. 1978). Auch für die Photoakustik wurden beispielsweise von Manohar et al. Phantome aus einem Polyvinylalkoholgel hergestellt, welche Brusttumoren darstellen sollten. Verschiedene Mischverhältnisse ließen eine Anpassung des Absorptionskoeffizienten des simulierten Tumorgewebes zu (Manohar et al. 2004). Bohndiek et al. beschreiben den Einsatz von Phantomen aus Polyvinylchlorid-Plastisol, welches in eine spezielle Acrylglasshalterung eingefügt wurde (Bohndiek et al. 2013). Eine weitere Möglichkeit besteht in der Herstellung einer Gelatinelösung, welche mittels Beigabe verschiedener Farbstoffe und einer Fettemulsion möglichst realitätsnah den Gewebekontrast in der Photoakustik widerspiegeln soll (Cook et al. 2011). Ziel dieser Arbeit war es allerdings zunächst ein Phantom frei von Störsignalen und Fremdkontrasten zu entwickeln, um das photoakustische Verhalten der Farbstoffe zu untersuchen. So konnte auch ein Abgleich der Absorption des reinen Farbstoffes getätigt stattfinden.

Der erste Ansatz der Phantomentwicklung, die Einarbeitung der Kontrastmittel in heißes Agarosegel bevor dieses gegossen wird, scheiterte primär an Artefakten, die das Gel produzierte. Hierbei handelte es sich vermutlich um feine Lufteinschlüsse oder nicht komplett gelöste Reste der pulverförmigen Agarose. Zudem war das Erhitzen ein nicht einschätzbarer Faktor, da zu den verwendeten Kontrastmitteln wenig bis keine Informationen über deren Thermostabilität vorlagen. Vor allem bei den Fluorophoren, welche an Proteine gekoppelt vorlagen sowie bei den Liposomen war eine Zerstörung der Struktur durch Erhitzen vergleichsweise wahrscheinlich.

Das direkte Einspritzen der Kontrastmittel in bereits ausgehärtete Blöcke aus Agarose eignete sich nicht als standardisierte Methode, da es nicht möglich war über definierte Volumina konstante, kalkulierbare Konzentrationen einzustellen. Zudem entstanden beim Einspritzen häufig Risse in der Agarose, welche wiederum photoakustische Störsignale produzierten. Generell stellte auch bei diesem Ansatz die Bildung von Artefakten innerhalb der Agarose ein Problem für die photoakustische Messung dar.

Das Schlauchphantom bot bereits konzeptionell Vorteile gegenüber dem Agarosephantom. Kommerziell werden für die Anwendung in Laboratorien optimierte Schläuche angeboten, was bedeutet dass sie sehr gleichmäßig, hochtransparent und mit einem glatten Innenraum gegen Anheftung von Substanzen gefertigt werden. Das Herstellen einer Agaroselösung setzt das Vorhandensein einer gewissen Laborausstattung voraus, es benötigt unter anderem eine Feinwaage, eine Mikrowelle oder Heizplatte und verschiedene Behältnisse. Gewisse Schwankungen in der Homogenität und Konzentration sind bei eigener Anfertigung immer anzunehmen. Zudem können Lufteinschlüsse beim Ausgießen entstehen, die ein gesamtes Phantom unbrauchbar machen. Darüber hinaus dauert die Herstellung eines Agarosephantoms vergleichsweise lang. Das Schlauchphantom wurde deswegen als zu bevorzugender Ansatz angesehen. Für eine Halterung erwies sich das Knetsilikon als ungeeignet, da es sehr starke Artefakte in der photoakustischen Messung zeigte. Zusätzliche Schwachpunkte waren die hohe Flexibilität des Materials und die mangelnde Abnutzungsresistenz, weshalb dieses Material für die Halterung ausgeschlossen wurde. Bei dem letztendlich eingesetzten Plexiglas handelt es sich um einen gut zu verarbeitenden, formstabilen und abnutzungsfesten Werkstoff. Zudem wurde die homogene Transparenz als günstig erachtet.

Die Auswahl eines geeigneten Schlauchs basierte auf dem photoakustischen Hintergrundsignal, wobei vor allem dessen Intensität und Homogenität beurteilt wurden (Abb. 12). Dabei wurde sehr viel Bedacht darauf gelegt dass weder in den Schläuchen noch auf deren Oberfläche Luftblasen saßen. Der PE-Schlauch wies ein sehr starkes, ungleichmäßig auftretendes photoakustisches Signal auf. Es wurde angenommen dass dies durch Verschmutzungen im Schlauchinnenraum sowie auf der Oberfläche verursacht wurde, ließ sich jedoch durch Reinigung nicht ausreichend

beheben. Eine weitere Erklärung wäre eine produktionsbedingte Inhomogenität im Material. Auch die vergleichsweise hohe Standardabweichung zeigte, dass mit dem PE Schlauch keine gute Reproduzierbarkeit innerhalb der Messungen erreicht wurde. Da zudem die Ausbildung deutlicher Peaks durch den PE Schlauch die Kontrastmittel-spezifischen Intensitätsschwankungen stark beeinflussen würde, wurde er als Bestandteil des Phantoms ausgeschlossen. Der PVC Mauskatheter wies ein weitaus geringeres photoakustisches Signal auf, welches dementsprechend schwächere Peaks ausbildete. Dennoch lag das Intensitätsniveau noch merklich über dem des Hintergrundes, welcher in der nicht bestückten Plexiglashalterung im destillierten Wasser gemessen wurde. Beim PVC Schlauch lag das gemessene photoakustische Signal vergleichbar zum Hintergrund, sodass dieser Schlauch für das Phantom ausgewählt wurde. Da bei den Kontrastmitteln photoakustische Signale von bis zu 15 Intensitätseinheiten (für ICG) gemessen wurden, kann die Intensität des Schlauchmaterials im Vergleich als zu vernachlässigen betrachtet werden. Sowohl der Mauskatheter als auch der PVC Schlauch zeigten kleinere Standardabweichungen als destilliertes Wasser, was für die Robustheit der Messungen im Schlauchphantom spricht. Der Wert von Hintergrund und Schlauch diente auch der Festsetzung eines Grenzwerts für die Messung der Verdünnungsstufen der Kontrastmittel. Erreichte eine Konzentration im Maximalwert nicht mindestens ca. 0,05 - 0,06 Intensitätseinheiten, wurde keine weitere Verdünnung getestet.

4.2. Evaluierung des Korrekturalgorithmus

Die Evaluierung des optionalen Korrekturalgorithmus erfolgte anhand der Spektralscans der zwei bekannten PA KM Methylenblau und ICG (Abb. 13). Der Kurvenverlauf erschien durch die Kompensation für die verschiedenen Energielevels der Wellenlängen geglättet, es kam zu weniger Schwankungen und Ausbildungen kleiner, spitzer Peaks. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass einige Schwankungen innerhalb des Messwerts des photoakustischen Signals nicht auf photothermische Effekte des Kontrastmittels, sondern auf inkonstante Energielevels des Lasers zurückzuführen waren. Dafür spricht auch die Existenz wiederkehrender Verläufe,

die sich in den Spektralscans beider Kontrastmittel sowie des Schlauchmaterials abbilden, wie die im Vergleich zum Gesamtverlauf hohe Signalintensität bei 680 nm und ein Peak bei etwa 720 nm. Erwartungsgemäß schwächte die mathematische Kompensation der Intensitätsschwankungen diese tendenziell als unspezifisch zu betrachtenden, wiederkehrenden Messwerte. Auch in Bezug auf die im nächsten Abschnitt noch einmal diskutierten verschiedenen Schallköpfe zeigte sich dass die mit dem Korrekturalgorithmus gemessenen Werte bei den meisten Kontrastmitteln stärker mit den Konzentrationen korrelierten, was sich sowohl in einem höheren Bestimmtheitsmaß, als auch in niedrigeren p-Werten ausdrückte. Insgesamt sind Messungen mit aktivierter Korrektur in zukünftigen Experimenten zu bevorzugen, da Intensitäten ohne die wellenlängenabhängigen Schwankungen als quantitatives Maß besser einsetzbar sind.

4.3. Vergleich der Schallköpfe

Die Schallköpfe mit ihren unterschiedlichen Wellenlängenbereichen zeigten einen deutlichen Unterschied in Bezug auf die gemessene Signalintensität (Abb. 14). Dabei war das empfangene photoakustische Signal, unabhängig vom verwendeten Kontrastmittel, beim Schallkopf dessen Messbereich im niedrigeren Frequenzbereich liegt (LZ250, 13 - 24 MHz) höher als beim höherfrequenten Schallkopf (LZ550, 32 - 55 MHz). Eine genaue Begründung im Rahmen eines mathematischen Modells würde den Rahmen dieser Arbeit überschreiten. Dennoch soll hier versucht werden, diese Beobachtung auf physikalisch-mathematischer Basis zu erklären. Grundlegend entsteht die emittierte Schallwelle durch im Nanosekundenbereich pulsierte Photonen, die eine lokale Erhitzung und thermoelastische Expansion bewirken (Haisch 2009). Das Ausmaß dieser Expansion und der Druck der Schallwelle hängen von vielen Faktoren ab, unter anderem der Frequenz, Wellenlänge und Intensität des Lasers, der Pulsdauer, aber vor allem auch den Eigenschaften des absorbierenden Materials. Der freigesetzte Druck und dessen Frequenz bestimmen die Signalintensität, welche in den piezoelektrischen Elementen im Schallkopf aufgefangen wird (Xu und Wang 2006). Da unabhängig vom Kontrastmittel in den hier vorgestellten Versuchen jedes Mal ein höheres Signal vom LZ250 aufgezeichnet

wurde, ist davon auszugehen dass durch den Vevo®LAZR mit seinen verfügbaren Wellenlängen und der festeingestellten Pulslänge vor allem Schallwellen im niedrigeren Wellenbereich erzeugt werden. Dementsprechend ist der LZ250 sensitiver und kann noch bei Konzentrationen von 1 % der Ausgangskonzentration der Kontrastmittel relevante photoakustische Signale auffangen. Bei einzelnen Kontrastmitteln ist aufgrund der immer noch relativ hohen Signalintensitäten sogar anzunehmen, dass auch noch geringere Konzentrationen messbar wären, allerdings wurden die Grenzen dessen nicht im Rahmen dieser Arbeit ermittelt. Zu beachten ist allerdings dass die Korrelation der mit dem LZ550 gemessenen Spektren mit den Konzentrationen der Kontrastmittel ein höheres Bestimmtheitsmaß aufwies, als die für den LZ250 berechnete. Die p-Werte lagen nichtsdestotrotz bei vier der sieben untersuchten Substanzen beim LZ250 niedriger. Bei drei Kontrastmitteln war es umgekehrt. Für die SM Liposomen konnte mit dem LZ550 gar kein brauchbarer Messwert erhoben werden. Die Erklärung hierfür ist in der Anzahl der Messwerte zu suchen, da beim LZ550 häufig weniger Messwerte erhoben werden konnten, wodurch der p-Wert höher ausfällt, da die Punkte leichter in eine lineare Abhängigkeit gebracht werden können. Fraglich ist ob demnach mit dem LZ550 eine exaktere Quantifizierung möglich wäre. Betrachtet man die Sensitivität (Tabelle 3) und die doch eher geringen Unterschiede in der Korrelation zwischen den Schallköpfen (Tabelle 2), ist insgesamt der LZ250 für weitere Versuche zu bevorzugen. Alternativ könnte vor dem Beginn eines Versuchs ein erneuter Vergleich zwischen den Schallköpfen für das vorgesehene Kontrastmittel durchgeführt werden, um den in diesem Fall angemessenen Schallkopf zu bestimmen. Neben den Parametern des photoakustischen Signals ist für die spätere *in vivo* Bildgebung auch die geringe Eindringtiefe des LZ550 zu berücksichtigen. In der Sonographie gilt generell, dass eine höhere Frequenz zwar die Auflösung erhöht, jedoch zugleich die Eindringtiefe reduziert (Sattler 2015). Dementsprechend beschränkt der Hersteller aufgrund der Eindringtiefe von ungefähr einem Zentimeter die Verwendung des LZ550 auf oberflächliche Strukturen. Hier werden zum Beispiel Mäusaugen, Mikrovaskulatur, Haut oder kleine orthotope Tumoren genannt (VisualSonics Inc. 2017). Ein konkretes Beispiel für die Verwendung konnte auch nach aufwendiger Literaturrecherche nicht gefunden werden.

4.4. Zusammenhang zwischen Absorption und photoakustischer Signalintensität

Es sollte überprüft werden, in welchem Verhältnis die Absorption zur photoakustischen Signalintensität steht, indem mit beiden Methoden Spektren über den Bereich von 680 - 970 nm für verschiedene Konzentrationen der PA KM aufgezeichnet wurden. Die für die Absorption verwendete photometrische Messmethode bestimmt die Anzahl an Photonen, die eine Substanz durchdringen und errechnet daraus eine einheitslose Variable. Bei hohen Absorptionen geben viele Photonen ihre Energie an die Materie ab, sodass hier auch eine höhere Erwärmung und somit photoakustische Aktivität erwartet wurde. Dies ließ sich beim Vergleich zwischen der Absorption und der PA Signalintensität bei den Wellenlängen 680 - 970 nm bestätigen. Die Kurvenverläufe der verschiedenen Spektralscans deckten sich bei Methylenblau sehr gut (Abb. 15). Auch bei ICG bildete sich ein ähnlicher Kurvenverlauf ab, der bei beiden Messverfahren im selben Wellenlängenbereich höhere Werte ergab (Abb. 16). Die photoakustischen Signale nahmen jedoch zunächst zwischen 680 und 690 nm leicht ab, während die Absorption im selben Bereich ihr Maximum erreichte. Die Korrelation von Photoakustik und Absorption zeigte sich als hoch signifikant über alle inbegriffenen Verdünnungen hinweg. Mit der Konzentration des jeweiligen Kontrastmittels nahm das Bestimmtheitsmaß der Korrelation ab. Erklärte die Absorption bei voller Ausgangskonzentration noch 91,83% der Schwankungen in der PA Signalintensität von Methylenblau, sind es bei 1 % ID nur noch 48,31 %. Auch bei ICG korrelieren beide Werte bei 10 %ID noch zu 99,33 %, bei 1 % ID nur noch zu 64,43 %. Eine Erklärung hierfür wäre die Stabilität der Messmethode an sich. Bei der Absorptionsmessung handelt es sich um einen sehr solides, hochstandardisiertes Verfahren, welches bei den meisten Stoffen linear verlaufen sollte, da die Hälfte an Molekülen auch die Hälfte des Lichts absorbieren sollte. Dies bestätigte sich in den hier gezeigten Messungen, der Kurvenverlauf bleibt annähernd identisch und verschiebt sich lediglich auf der x-Achse. Der photoakustische Effekt ist komplexer, da er die Absorption nur als einen mehrerer Faktoren beinhaltet, die das Ergebnis beeinflussen. Hinzu kommen beispielsweise die Wärmeleitfähigkeit oder der Grüneisen Parameter, der die thermodynamischen Eigenschaften eines Gewebes

definiert (Cox et al. 2012; Beard 2011). Insgesamt zeigen die Ergebnisse des Vergleichs aber, dass Absorption und photoakustisches Signal stark korrelieren und sich auch die Kurvenverläufe, zumindest bei höheren Konzentrationen, ähnlich abbilden: In Bereichen mit hoher Absorption findet sich zumeist auch ein hohes photoakustisches Signal, Signalabfall und Bereiche mit niedrigen Signalen entsprechen sich ebenfalls. Dies deckt sich mit Literaturangaben die der Photoakustik 100% Sensitivität gegenüber kleinen Variationen der optischen Absorption zuschreiben, was bedeuten soll, dass jede Veränderung des optischen Absorptionskoeffizienten eine Änderung des PA Signals um denselben Prozentsatz bewirkt (Wang und Yao 2016). Die hier gezeigten Korrelationen bestätigen auch die Eignung von Methylenblau und ICG als PA KM, was bereits in vielen verschiedenen Anwendungen etabliert werden konnte (Jeon et al. 2014; Kiesslich et al. 2003; Zhong et al. 2013; Zanganeh et al. 2013).

Trotz dieser klaren Übereinstimmung in den hier gezeigten Beispielen sollte betont werden, dass eine hohe Absorption zwar Voraussetzung für die Eignung zum PA KM ist, jedoch nicht unbedingt diese bewirkt. Aus dem Anregungslicht absorbierte Energie kann als Wärme abgegeben werden und somit die thermoelastische Expansion bewirken, allerdings sind Fluoreszenzfarbstoffe auf die Abgabe dieser Energie in Form von Photonen optimiert. Somit kann von einer hohen Absorption nicht automatisch auf eine hohe photoakustische Aktivität geschlossen werden und ist lediglich als Indikator für potentielle Intensität und Wellenlängenbereich des Signals zu werten. Die Verwendbarkeit der Absorption in dieser Weise wird auch durch den Vergleich der Wellenlängen der durch die Hersteller angegebenen Absorptionsmaxima mit den in dieser Arbeit ermittelten Maxima des photoakustischen Signals unterstützt, da sich, mit wenigen Ausnahmen, beide in vergleichbaren Wellenlängenbereichen befinden. In der aktuellen Literatur wird die optische Absorption ebenfalls meist als relevante Information zu einem neuen Farbstoff angegeben (Zou et al. 2017).

4.5. Evaluierung der kommerziellen Fluoreszenzfarbstoffe und Nanopartikel

Die Verwendung von PA KM wird als unausweichlich erachtet, um die Sensitivität und Spezifität des Geräts zu bestimmen (Wang 2008). Bei allen Fluoreszenz- und Nanopartikel-Farbstoffen wurde die Bildung eines Peaks erwartet, welcher in einem mit dem Absorptionsmaximum vergleichbaren Wellenlängenbereich liegt. Ein deutlicher Peak ist Voraussetzung für den erfolgreichen Einsatz als photoakustisches Kontrastmittel, da nur hierüber eine Abgrenzung zu den photoakustischen Hintergrundsignalen der im Körper vorkommenden Gewebe möglich ist. Zudem muss die Signalintensität hoch genug liegen um für die Sensitivität des Geräts auszureichen und ein Überstrahlen durch den Hintergrund zu verhindern. Eine letzte Anforderung an die Kontrastmittel ist die Konzentrationsabhängigkeit des Signals, da nur diese eine Quantifizierung ermöglicht.

Von den kommerziellen Fluoreszenzfarbstoffen zeigten IntegriSense™ 750, IRDye®800CW als Carboxylat und mit gekoppeltem EGF die gewünschten Peaks, die bei der für das Absorptionsmaximum angegebenen Wellenlänge lagen (Abb. 17 C - 17E). Zudem erzeugten diese drei Kontrastmittel eine vergleichsweise hohe Signalintensität, die deutlich über dem Hintergrundsignal des Schlauchphantoms lag, sodass IntegriSense™ 750 und IRDye®800CW Carboxylate sogar noch in der niedrigsten getesteten Konzentration von diesem abgrenzbar waren. IRDye®800CW EGF war bis zu 3 % der Initialdosis noch vom Hintergrund differenzierbar. IRDye®800CW Carboxylate könnte als Marker des Blutvolumens verwendet werden, eignet sich durch seine chemische Vorbereitung in dieser Form nicht für die Kopplung an andere Substanzen. IRDye®800CW ohne Carboxylat wurde bereits an den von Neutropilin-1 Rezeptor konjugiert für die photoakustische Spektroskopie zur Darstellung von Mammakarzinomen *in vivo* verwendet (Stantz et al. 2010). IntegriSense™ 750 als Marker für die Expression des Integrins $\alpha_v\beta_3$ könnte nach den hier gewonnen Erkenntnissen als PA KM für *in vivo* Studien zur Erforschung von Tumoren oder Entzündungen verwendet werden. Allerdings muss zunächst untersucht werden inwiefern sich der Peak bei 740-745 nm von dem PA Maximum von desoxygeniertem Hämoglobin unterscheiden lässt, welches bei

750 nm gemessen wird. Hierzu finden sich bisher keine Publikationen die IntegriSense™ 750 für die Photoakustik verwendet haben.

Die Spektren des Alexa Fluor® 488 und Genhance™ 680 (Abb. 17A und B) mit ihrem Maximalwert bei 680 nm entsprachen ebenfalls teils den Erwartungen, da das Absorptionsmaximum beider Farbstoffe unterhalb der beim Vevo®LAZR verfügbaren Wellenlängen lag. Für die Verwendung als Kontrastmittel sind Alexa Fluor® 488 und Genhance™ 680 jedoch nicht optimal verwendbar, da sich der Peak an der Grenzwellenlänge nur mit Maximum und Signalabfall darstellen lässt, der Anstieg jedoch fehlt. Dadurch ist der Verlauf weniger charakteristisch und rechnerisch schwerer in einem inhomogenen Signal abgrenzbar. Eine weitere Schwierigkeit stellt der bei 680 nm beobachtete unspezifische Peak in allen Schläuchen und Hintergrundmessungen dar (Abb. 12). Die Signalintensitäten bei Alexa Fluor® 488 und Genhance™ 680 waren abgesehen vom Maximalwert nur gering, die Nachweisgrenzen dementsprechend mit 10 %ID hoch, sodass eine Differenzierung vom Hintergrund schwierig würde. Die Ergebnisse sind vor allem in Bezug auf das Alexa Fluor® 488 mit dem konjugierten Goldkolloid unerwartet, da hier eine Verstärkung des PA Signals durch die hohe Energieabsorption und Wärmeleitfähigkeit des Metalls erwartet wurde. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre dass die maximale Absorption mit 496 nm zu weit außerhalb des vom Vevo®LAZR angebotenen Wellenlängenbereichs liegt und deshalb insgesamt nur wenig Energie vom Fluorophor aufgenommen wird. Trotzdem hätte man ein stärkeres Signal von den Goldpartikeln erwartet, da diese sogar als eigenständiges PA KM ohne Fluoreszenzfarbstoff eingesetzt werden (Pan et al. 2011). Allerdings verfolgen neuere Entwicklungen nur noch selten die ursprünglichen Goldkolloide und haben sich stattdessen auf andere Strukturen, wie Gold Nanocages, Nanorods oder Nanovesikel fokussiert, da diese ein höheres Signal erzeugen (Li und Chen 2015). Somit ist es möglich, dass die für den Fluoreszenzfarbstoff optimierte Konzentration zu gering ist, um ein deutliches Signal durch die konjugierten Goldkolloide zu erzeugen. Abgesehen von der hier getesteten Variante wird Alexa Fluor® auch in vielen anderen Varianten mit Fluorophoren anderer Wellenlängen angeboten. Alexa Fluor® 750 wurde bereits in publizierten Versuchen photoakustisch dargestellt, unter anderem für die Darstellung von Brustkrebs vermittelt durch HER2 (Bhattacharyya et al. 2008). Gleiches gilt für Genhance™, welches in seiner Variante mit einem

Emissionsmaximum bei 750 nm als verstärkender Farbstoff des Blutvolumens in der photoakustischen Bildgebung verwendet wurde (Zhou et al. 2016).

IRDye®800CW RGD zeigte so niedrige Signale, dass bereits die Ausgangskonzentration nicht zur Darstellung eines klaren Spektrums und zur Abgrenzung gegenüber dem Schlauchphantom ausreichte, der Farbstoff wird als unbrauchbar für die photoakustische Bildgebung angesehen. Dass der gleiche Fluorophor als Carboxylat und mit EGF deutlich höhere Signale erzeugte, ist überraschend. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre eine fehlerhafte Lagerung des KM, die zu einem Zerfall des Fluorophors führte oder ein weiterer Anwendungsfehler. Eine derartig prägnante Auswirkung der RGD-Sequenz auf das PA Signal des IRDye®800CW ist unwahrscheinlich.

Nanopartikel-basierte KM gehören zu den meist angewandten PA KM (Yang et al. 2009). Auch die Verwendung von ICG als photoakustisch aktives KM in Nanopartikeln wurde bereits in verschiedenen Anwendungen beschrieben. (Nie und Chen 2014). Die Spektren der hier getesteten Nanopartikel Kontrastmittel, welche ebenfalls ICG enthielten, zeigten alle Peaks relativ hoher Intensitäten rund um 800 nm. Dies wurde für den Farbstoff ICG erwartet (Abb. 18). Die Nachweisgrenze lag bei den thermosensitiven Liposomen und den mit Micromod gekoppelten Liposomen noch unter der hier getesteten minimalen Konzentration (Tab. 3). Die PC Liposomen waren bei 1 %ID nicht mehr identifizierbar, die SM Liposomen bereits bei 3 %ID, womit beide eine vergleichsweise niedrige Nachweisgrenze zeigen. Bei den mit SPIOs gekoppelten Liposomen war eine hohe Signalverstärkung erwartet worden, da Metalle eine sehr hohe Photonenabsorption und gute Wärmeleitfähigkeit besitzen (weshalb Metall sich in der Sonne stark erhitzt). Mögliche Effekte wären also eine Verstärkung des Fluoreszenzpeaks des ICG durch Energieübertragung oder die Bildung eines eigenen, größtenteils wellenlängenunabhängigen Peaks hoher Intensität, der vom Eisenoxidpartikel selber ausgeht. Bei den 100 nm Micromod Liposomen trat der gewünschte Effekt ein, die PA Signalintensität erreichte ein deutlich höheres Niveau als alle anderen Liposomen. Der Peak blieb mit 810 nm im Bereich des vom ICG erwarteten Maximums bei ca. 800 nm.

5. Zusammenfassung

Insgesamt konnten in dieser Arbeit viele Erkenntnisse zur Durchführung der Photoakustikmessung am Vevo®LAZR gewonnen werden, die für spätere Studien eine zentrale Bedeutung haben werden.

Mit einer Plexiglashalterung für dünne PVC-Schläuchen, die in einem Wasserbad versenkt wird, wurde ein günstiges, wiederverwertbares, einfach zu handhabendes Phantom entwickelt. Die darin gewonnenen Messwerte sind standardisiert und reproduzierbar und liefern eine schnelle Charakterisierung von Kontrastmitteln.

Die Verwendung des optionalen Korrekturalgorithmus wird aufgrund des geglätteten Kurvenverlaufs und der meist höheren Konzentrationsabhängigkeit für weitere Experimente empfohlen. Beim Vergleich der Schallköpfe zeigte sich zudem, dass der LZ250 zu bevorzugen ist, was sich vor allem durch eine deutlich höhere Signalintensität und die dadurch niedrigere Nachweisgrenze auszeichnete. Die ist vor allem in Bezug auf zukünftige *in vivo* Messungen entscheidend, wo die spezifischen Signale ausreichen müssen um Gewebe zu durchdringen und sich gegenüber den Hintergrundsignalen, zum Beispiel durch Hämoglobin, abgrenzen zu lassen.

Anhand der etablierten Photoakustikkontrastmittel Methylenblau und ICG konnte gezeigt werden, dass die Absorption eine gute Kenngröße ist, um das photoakustische Spektrum eines neuen Stoffes einzuschätzen. Dafür sprachen auch die meist nahe beieinander liegenden Werte der Herstellerangabe des Absorptionsmaximums und des photoakustischen Maximums bei den weiteren getesteten Substanzen.

Die hier untersuchten Fluoreszenzfarbstoffe eignen sich teils sehr gut für die Photoakustik. Vor allem der IRDye®800CW Carboxylate scheint ein geeignetes Kontrastmittel zu sein. Allerdings hängt die Signalintensität von der Kopplung an andere Moleküle ab, sodass der Fluorophor mit EGF bereits weniger und mit RGD annähernd kein Signal zeigt. Ein photoakustischer *in vivo* Nachweis von Integrinen wäre mit IntegriSense™ 750 prinzipiell denkbar, müsste jedoch aufgrund der übereinstimmenden Hauptpeaks zunächst auf seine Abgrenzbarkeit vom Signal des

desoxygeniertem Hämoglobins untersucht werden. Die Nanopartikel-basierten Kontrastmittel eignen sich insgesamt alle sehr gut für die Photoakustik, da sie klare Peaks hoher Intensität bilden, welche konzentrationsabhängig auch bei hohen Verdünnungen erhalten bleiben. Die Nanopartikel bieten ein breites Anwendungsspektrum, da das Signal des eingeschlossenen ICGs bei allen Änderungen der Lipidhülle und deren Oberfläche annähernd konstant blieb. Dies lässt darauf schließen, dass sich durch die Kopplung von Liganden auf der Partikeloberfläche eine spezifische Markierung von Strukturen *in vivo* erreichen ließe, welche durch Integration geeigneter SPIOs (wie 100 nm Micromods) ein hohes Signal und somit eine gute Sensitivität aufweisen würden.

In Zukunft müsste nun untersucht werden, wie gut sich die hier als geeignet herausgearbeiteten Kontrastmittel im lebenden Organismus auffinden lassen und inwiefern interne Hintergrundsignale mit dem Spektrum oder der Signalintensität interferieren. Besonders interessant wird hierbei, bis in welche Tiefe einzelne Kontrastmittel identifizierbar sind, da hier ja der spezielle Vorteil der Photoakustik gegenüber der Fluoreszenzbildgebung liegt. Mit dieser Arbeit wurde somit ein Grundstein gelegt, auf dessen Basis in Zukunft Fragestellungen zu Pathologien und physiologischen Vorgängen auf molekularer Ebene im lebenden Organismus mit Hilfe der photoakustischen Bildgebung angegangen werden können.

6. Literaturverzeichnis

- Barenholz, Yechezkel (2012): Doxil(R)--the first FDA-approved nano-drug: lessons learned. In: *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* 160 (2), S. 117–134.
- Beard, Paul (2011): Biomedical photoacoustic imaging. In: *Interface focus* 1 (4), S. 602–631.
- Bergin, C.; O'Leary, A.; McCreary, C.; Sabra, K.; Mulcahy, F. (1995): Treatment of Kaposi's sarcoma with liposomal doxorubicin. In: *American Journal of Health-System Pharmacy* 52 (18), S. 2001–2004.
- Bhattacharyya, Sibaprasad; Wang, Shuyan; Reinecke, Daniel; Kiser, William, JR; Kruger, Robert A.; DeGrado, Timothy R. (2008): Synthesis and evaluation of near-infrared (NIR) dye-herceptin conjugates as photoacoustic computed tomography (PCT) probes for HER2 expression in breast cancer. In: *Bioconjugate chemistry* 19 (6), S. 1186–1193.
- Bohndiek, Sarah E.; Bodapati, Sandhya; van de Sompel, Dominique; Kothapalli, Sri-Rajasekhar; Gambhir, Sanjiv S. (2013): Development and application of stable phantoms for the evaluation of photoacoustic imaging instruments. In: *PloS one* 8 (9), e75533.
- Chang, S.; Guo, J.; Sun, J.; Zhu, S.; Yan, Y.; Zhu, Y. et al. (2013): Targeted microbubbles for ultrasound mediated gene transfection and apoptosis induction in ovarian cancer cells. In: *Ultrasonics sonochemistry* 20 (1), S. 171–179.
- Cook, Jason R.; Bouchard, Richard R.; Emelianov, Stanislav Y. (2011): Tissue-mimicking phantoms for photoacoustic and ultrasonic imaging. In: *Biomedical optics express* 2 (11), S. 3193–3206.
- Cox, Ben; Laufer, Jan G.; Arridge, Simon R.; Beard, Paul C. (2012): Quantitative spectroscopic photoacoustic imaging: a review. In: *Journal of biomedical optics* 17 (6), S. 61202.
- Desgrosellier, Jay S.; Cheresh, David A. (2010): Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities. In: *Nature reviews. Cancer* 10 (1), S. 9–22.
- Deshpande, Pranali P.; Biswas, Swati; Torchilin, Vladimir P. (2013): Current trends in the use of liposomes for tumor targeting. In: *Nanomedicine (London, England)* 8 (9), S. 1509–1528.
- Erpelding, Todd N.; Kim, Chulhong; Pramanik, Manojit; Jankovic, Ladislav; Maslov, Konstantin; Guo, Zijian et al. (2010): Sentinel lymph nodes in the rat: noninvasive photoacoustic and US imaging with a clinical US system. In: *Radiology* 256 (1), S. 102–110.
- Haisch, Christoph (2009): Quantitative analysis in medicine using photoacoustic tomography. In: *Analytical and bioanalytical chemistry* 393 (2), S. 473–479.
- Hill, Tanner K.; Abdulahad, Asem; Kelkar, Sneha S.; Marini, Frank C.; Long, Timothy E.; Provenzale, James M.; Mohs, Aaron M. (2015): Indocyanine green-loaded nanoparticles for image-guided tumor surgery. In: *Bioconjugate chemistry* 26 (2), S. 294–303.
- Jenkins, R. W.; Canals, D.; Hannun, Y. A. (2009): Roles and Regulation of Secretory and Lysosomal Acid Sphingomyelinase. In: *Cellular signalling* 21 (6), S. 836–846.
- Jeon, Mansik; Song, Wentao; Huynh, Elizabeth; Kim, Jungho; Kim, Jeesu; Helfield, Brandon L. et al. (2014): Methylene blue microbubbles as a model dual-modality contrast agent for ultrasound and activatable photoacoustic imaging. In: *Journal of biomedical optics* 19 (1), S. 16005.

- Kang, Hye-Min; Sohn, Inkyung; Kim, Seunggyu; Kim, Daehwan; Jung, Junyang; Jeong, Joo-Won; Park, Chan (2015): Optical measurement of mouse strain differences in cerebral blood flow using indocyanine green. In: *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 35 (6), S. 912–916.
- Kang, S. T.; Yeh, C. K. (2012): Ultrasound microbubble contrast agents for diagnostic and therapeutic applications: current status and future design. In: *Chang Gung medical journal* 35 (2), S. 125–139.
- Kiesslich, Ralf; Fritsch, Johannes; Holtmann, Martin; Koehler, Heinz H.; Stolte, Manfred; Kanzler, Stephan et al. (2003): Methylene blue-aided chromoendoscopy for the detection of intraepithelial neoplasia and colon cancer in ulcerative colitis. In: *Gastroenterology* 124 (4), S. 880–888.
- Kim, Jihoon; Oh, Junghwan; Kang, Hyun Wook; Feldman, Marc D.; Milner, Thomas E. (2008): Photothermal response of superparamagnetic iron oxide nanoparticles. In: *Lasers in surgery and medicine* 40 (6), S. 415–421.
- Kneidl, Barbara; Peller, Michael; Winter, Gerhard; Lindner, Lars H.; Hossann, Martin (2014): Thermosensitive liposomal drug delivery systems: state of the art review. In: *International journal of nanomedicine* 9, S. 4387–4398.
- Kraft, John C.; Freeling, Jennifer P.; Wang, Ziyao; Ho, Rodney J. Y. (2014): Emerging research and clinical development trends of liposome and lipid nanoparticle drug delivery systems. In: *Journal of pharmaceutical sciences* 103 (1), S. 29–52.
- Li, Wanwan; Chen, Xiaoyuan (2015): Gold nanoparticles for photoacoustic imaging. In: *Nanomedicine (London, England)* 10 (2), S. 299–320.
- Madsen, E. L.; Zagzebski, J. A.; Banjavie, R. A.; Jutila, R. E. (1978): Tissue mimicking materials for ultrasound phantoms. In: *Medical physics* 5 (5), S. 391–394.
- Manohar, Srirang; Kharine, Alexei; van Hespen, Johan C. G.; Steenbergen, Wiendelt; van Leeuwen, Ton G. (2004): Photoacoustic mammography laboratory prototype: imaging of breast tissue phantoms. In: *Journal of biomedical optics* 9 (6), S. 1172–1181.
- Marshall, Milton V.; Rasmussen, John C.; Tan, I-Chih; Aldrich, Melissa B.; Adams, Kristen E.; Wang, Xuejuan et al. (2010): Near-Infrared Fluorescence Imaging in Humans with Indocyanine Green: A Review and Update. In: *Open surgical oncology journal (Online)* 2 (2), S. 12–25.
- Mordon, S.; Devoisselle, J. M.; Soulie-Begu, S.; Desmettre, T. (1998): Indocyanine green: physicochemical factors affecting its fluorescence in vivo. In: *Microvascular research* 55 (2), S. 146–152.
- Nakano, Toru; Sakurai, Tadashi; Maruyama, Shota; Ozawa, Yohei; Kamei, Takashi; Miyata, Go; Ohuchi, Noriaki (2015): Indocyanine green fluorescence and three-dimensional imaging of right gastroepiploic artery in gastric tube cancer. In: *World journal of gastroenterology* 21 (1), S. 369–372.
- Narenji, M.; Talaei, M. R.; Moghimi, H. R. (2016): Investigating the effects of size, charge, viscosity and bilayer flexibility on liposomal delivery under convective flow. In: *International journal of pharmaceutics* 513 (1-2), S. 88–96.
- Nie, Liming; Chen, Xiaoyuan (2014): Structural and functional photoacoustic molecular tomography aided by emerging contrast agents. In: *Chemical Society reviews* 43 (20), S. 7132–7170.
- Pan, Dipanjan; Pramanik, Manojit; Wickline, Samuel A.; Wang, Lihong V.; Lanza, Gregory M. (2011): Recent advances in colloidal gold nanobeacons for molecular photoacoustic imaging. In: *Contrast media & molecular imaging* 6 (5), S. 378–388.

- Rowinsky, Eric K. (2004): The erbB family: targets for therapeutic development against cancer and therapeutic strategies using monoclonal antibodies and tyrosine kinase inhibitors. In: *Annual review of medicine* 55, S. 433–457.
- Rukavina, Zora; Vanic, Zeljka (2016): Current Trends in Development of Liposomes for Targeting Bacterial Biofilms. In: *Pharmaceutics* 8 (2).
- Sano, Kohei; Nakajima, Takahito; Ali, Towhid; Bartlett, Derek W.; Wu, Anna M.; Kim, Insook et al. (2013): Activatable fluorescent cys-diabody conjugated with indocyanine green derivative: consideration of fluorescent catabolite kinetics on molecular imaging. In: *Journal of biomedical optics* 18 (10), S. 101304.
- Schirmer, R. Heiner; Adler, Heike; Pickhardt, Marcus; Mandelkow, Eckhard (2011): "Lest we forget you--methylene blue...". In: *Neurobiology of aging* 32 (12), 2325.e7-16.
- Schulz, Ralf B.; Ale, Angelique; Sarantopoulos, Athanasios; Freyer, Marcus; Soehngen, Eric; Zientkowska, Marta; Ntziachristos, Vasilis (2010): Hybrid system for simultaneous fluorescence and x-ray computed tomography. In: *IEEE transactions on medical imaging* 29 (2), S. 465–473.
- Stantz, Keith M.; Cao, Minsong; Liu, Bo; Miller, Kathy D.; Guo, Lili (2010): Molecular imaging of neutropilin-1 receptor using photoacoustic spectroscopy in breast tumors. In: Alexander A. Oraevsky und Lihong V. Wang (Hg.). BIOS. San Francisco, California, Saturday 23 January 2010: SPIE (SPIE Proceedings), 75641O.
- Takada, Yoshikazu; Ye, Xiaojing; Simon, Scott (2007): The integrins. In: *Genome biology* 8 (5), S. 215.
- Taruttis, Adrian; Ntziachristos, Vasilis (2012): Translational optical imaging. In: *AJR. American journal of roentgenology* 199 (2), S. 263–271.
- van der Vorst, Joost R.; Hutteman, Merlijn; Mieog, J. Sven D.; Rooij, Karien E. de; Kaijzel, Eric L.; Lowik, Clemens W. G. M. et al. (2012): Near-infrared fluorescence imaging of liver metastases in rats using indocyanine green. In: *The Journal of surgical research* 174 (2), S. 266–271.
- VisualSonics Inc. (2017): Vevo LAZR LZ Transducers. Hg. v. VisualSonics Inc. Online verfügbar unter <http://www.visualsonics.com/products/vevo-lazr-photoacoustic-imaging/lz-transducers> (abgerufen am 15.01.2017).
- Wang, Lihong V. (2008): Prospects of photoacoustic tomography. In: *Medical physics* 35 (12), S. 5758–5767.
- Wang, Xueding; Xie, Xueyi; Ku, Geng; Wang, Lihong V.; Stoica, George (2006): Noninvasive imaging of hemoglobin concentration and oxygenation in the rat brain using high-resolution photoacoustic tomography. In: *Journal of biomedical optics* 11 (2), S. 24015.
- Wang, Lihong V.; Yao, Junjie (2016): A practical guide to photoacoustic tomography in the life sciences. In: *Nature methods* 13 (8), S. 627–638.
- Weissleder, R.; Mahmood, U. (2001): Molecular imaging. In: *Radiology* 219 (2), S. 316–333.
- Weissleder, Ralph; Ntziachristos, Vasilis (2003): Shedding light onto live molecular targets. In: *Nature medicine* 9 (1), S. 123–128.
- Will, Olga Maria; Purcz, Nicolai; Chalaris, Athena; Heneweer, Carola; Boretius, Susann; Purcz, Larissa et al. (2016): Increased survival rate by local release of diclofenac in a murine model of recurrent oral carcinoma. In: *International journal of nanomedicine* 11, S. 5311–5321.
- Xia, J.; Yao, J.; Wang, L. V. (2014): Photoacoustic tomography: principles and advances. In: *Electromagnetic waves (Cambridge, Mass.)* 147, S. 1–22.

- Xu, Minghua; Wang, Lihong V. (2006): Photoacoustic imaging in biomedicine. In: *Review of Scientific Instruments* 77 (4), S. 41101.
- Yang, Xinmai; Stein, Erich W.; Ashkenazi, S.; Wang, Lihong V. (2009): Nanoparticles for photoacoustic imaging. In: *Wiley interdisciplinary reviews. Nanomedicine and nanobiotechnology* 1 (4), S. 360–368.
- Yuan, Baohong; Chen, NanGuang; Zhu, Quing (2004): Emission and absorption properties of indocyanine green in Intralipid solution. In: *Journal of biomedical optics* 9 (3), S. 497–503.
- Zackrisson, S.; van de Ven, S. M. W. Y.; Gambhir, S. S. (2014): Light in and sound out: emerging translational strategies for photoacoustic imaging. In: *Cancer research* 74 (4), S. 979–1004.
- Zanganeh, Saeid; Li, Hai; Kumavor, Patrick D.; Alqasemi, Umar; Aguirre, Andres; Mohammad, Innus et al. (2013): Photoacoustic imaging enhanced by indocyanine green-conjugated single-wall carbon nanotubes. In: *Journal of biomedical optics* 18 (9), S. 96006.
- Zhang, Lingbo; Wang, Kezheng; Zhao, Falin; Hu, Weiping; Chen, Junjie; Lanza, Gregory M. et al. (2012): Near infrared imaging of EGFR of oral squamous cell carcinoma in mice administered arsenic trioxide. In: *PloS one* 7 (9), e46255.
- Zhao, Ping; Yang, Xiaoyang; Qi, Shibo; Liu, Hongguang; Jiang, Han; Hoppmann, Susan et al. (2013): Molecular imaging of hepatocellular carcinoma xenografts with epidermal growth factor receptor targeted affibody probes. In: *BioMed research international* 2013, S. 759057.
- Zhong, Junping; Yang, Sihua; Zheng, Xiaohui; Zhou, Ting; Xing, Da (2013): In vivo photoacoustic therapy with cancer-targeted indocyanine green-containing nanoparticles. In: *Nanomedicine (London, England)* 8 (6), S. 903–919.
- Zhou, Heling; Campbell, James; O'Kelly, Devin; Gerberich, Jeni; Mason, Ralph (2016): Exploring a fluorescent blood pool agent in photoacoustic imaging. In: *J Nucl Med* 57 (supplement 2), S. 1214.
- Zhou, Yu; Gu, Haitao; Xu, Yan; Li, Fan; Kuang, Shaojing; Wang, Zhigang et al. (2015): Targeted antiangiogenesis gene therapy using targeted cationic microbubbles conjugated with CD105 antibody compared with untargeted cationic and neutral microbubbles. In: *Theranostics* 5 (4), S. 399–417.
- Zhu, B.; Sevic-Muraca, E. M. (2015): A review of performance of near-infrared fluorescence imaging devices used in clinical studies. In: *The British journal of radiology* 88 (1045), S. 20140547.
- Zou, Chunpeng; Wu, Beibei; Dong, Yanyan; Song, Zhangwei; Zhao, Yaping; Ni, Xianwei et al. (2017): Biomedical photoacoustics: fundamentals, instrumentation and perspectives on nanomedicine. In: *International journal of nanomedicine* 12, S. 179–195.

7. Anhang

7.1. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Photoakustische Spektren von oxygeniertem Hämoglobin, desoxygeniertem Hämoglobin und Melanin.	4
Abb. 2: Vevo®2100 Kleintierultraschallgerät mit Vevo®LAZR für die Photoakustik.....	5
Abb. 3: Schallköpfe für die Photoakustik mit simultanem Ultraschall.	5
Abb. 4: Absorptions- und Emissionsspektrum des Alexa Fluor® 488.	12
Abb. 5 : Absorptions- und Emissionsspektrum Genhance™ 680.	13
Abb. 6 : Absorptions- und Emissionsspektrum IntegrISense 750.	13
Abb. 7 : Absorptions- und Emissionsspektrum von IReDye 800 CW.	14
Abb. 8 : Absorptions- und Emissionsspektrum des IReDye® 800CW EGF.	15
Abb. 9: Absorptions- und Emissionsspektrum IR Dye 800 RGD.	15
Abb. 10: Verdünnungsschema für die Kontrastmittel.	20
Abb. 11: Vevo Imaging Station und LAZRTight™ Imaging Station Enclosure.	22
Abb. 12: Gemittelte photoakustische Spektralscans der verschiedenen Schlauchmaterialien im Phantom mit der Standardabweichung.	24
Abb. 13 : Photoakustik Spektralscans von Methylenblau und ICG mit und ohne Korrekturalgorithmus.....	26
Abb. 14 : Photoakustik Spektralscans verschiedener Kontrastmittel mit dem LZ250- und LZ550-Schallkopf.	28
Abb. 15: Absorption und photoakustische Signalintensität von Methylenblau in drei repräsentativen Konzentrationen.	30
Abb. 16 : Absorption und photoakustische Signalintensität von ICG in drei repräsentativen Konzentrationen.	31
Abb. 17 : Photoakustische Spektralscans der untersuchten Fluoreszenzfarbstoffe aller gemessenen Konzentrationen.	33
Abb. 18: Photoakustische Spektralscans der untersuchten Nanopartikel aller gemessenen Konzentrationen.	35
Abb. 19: Vergleich der maximalen photoakustischen Signale der höchsten Konzentration aller Kontrastmittel.	37

7.2. Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Kommerzielle Fluoreszenz- und Photoakustikkontrastmittel.	11
Tab. 2: Lineare Korrelation der Konzentration des Kontrastmittels mit der photoakustischen Signalintensität bei der Wellenlänge des Hauptpeaks	28
Tab. 3: Nachweisgrenze des photoakustischen Signals der Verdünnungen verschiedener Kontrastmittel im Vergleich der Laserschallköpfe LZ250 und LZ550.....	29
Tab. 4: Korrelation der Absorption mit der photoakustischen Signalintensität bestimmt durch die Rangkorrelation nach Spearman.....	32
Tab. 5: Übersicht über alle Kontrastmittel mit Herstellerangaben zu Ausgangskonzentration und Absorptionsmaximum sowie ermittelte Wellenlänge und Intensität des maximalen photoakustischen Signals.	38

7.3. Abkürzungsverzeichnis

a.u.	<i>arbitrary units</i> , willkürliche Einheit für einheitslose Parameter
dB	Dezibel
DPPC	Dipalmitoylphosphatidylcholin
DOTAP	Cholesterin,N-(2,3-Dioleoyloxy-1propyl)trimethylammoniummethylsulfat
DPBS	Dulbecco`s <i>Phosphate-buffered saline</i>
DSPC	1,2-Distearoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholin
EGF	<i>epidermal growth factor</i> , epidermaler Wachstumsfaktor
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i> , epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor
ICG	Indocyaningrün
ID	Initialdosis
KM	Kontrastmittel
MRT	Magnetresonanztomographie
Methylenblau	3,7-Bis(dimethylamino)-phenothiaziniumchlorid
MHz	Megahertz
Micromod 20 nm	nanomag®-CLD-spio mit 20 nm Durchmesser
Micromod 100 nm	nanomag®-CLD-spio mit 100 nm Durchmesser
Nd/YAG-Laser	Neodym-dotierter Yttrium-Aluminium-Granat-Laser
NHS-Ester	N-Hydroxysuccinimidester
NIR	nahes Infrarot
nm	Nanometer
PA	Photoakustik
PC Liposomen	Phosphocholin Liposomen
PE	Polyethylen
PVC	Polyvinylchlorid
p-Wert	Signifikanzwert
RGD	Arginin-Glycin-Asparaginsäure
ROI	<i>region of interest</i>
R ²	Bestimmtheitsmaß der Korrelation nach Pearson
SM	Sphingomyelin
SM Liposomen	Sphingomyelin Liposomen
SPIO	<i>superparamagnetic iron oxide</i> , Eisenoxidpartikel
TS Liposomen	Thermosensitive Liposomen

7.4. Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, Lukas Baltz, geboren am 15. Juni 1982 in Rendsburg, die vorliegende Dissertation „Charakterisierung der photoakustischen Eigenschaften von Kontrastmitteln“ selbstständig und ausschließlich unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel verfasst zu haben und dass diese Arbeit nicht als Dissertation bei einer anderen Fakultät oder einem anderen Fachbereich eingereicht wurde.

Kiel, den

Lukas Baltz

7.5. Danksagung

Herrn Prof. Dr. Y. Açil danke ich sehr für die freundliche Überlassung dieses interessanten Promotionsthemas und besonderen Dank für das Engagement zur Beendigung der Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Dr. J. Wiltfang als Direktor der Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein Campus Kiel danke ich für die Möglichkeit an der Klinik diese wissenschaftliche Arbeit durchführen zu können.

Mein besonderer Dank gilt meinen Betreuern Herr Dr. Nicolai Purcz und Frau Dr. Carola Heneweer. Sie hatten das Thema meiner Dissertation ausgewählt und mich stets mit Ihrer Anleitung bei der Durchführung unterstützt, diese wissenschaftliche Arbeit erfolgreich durchzuführen. Vor allem danke ich ihnen aber für Ihre unermüdliche moralische Unterstützung und die außerordentlich angenehme Zusammenarbeit.

Dank gilt zudem PD Ph. D. Oula Peñate Medina für die Bereitstellung der Liposomen.

Von ganzem Herzen danke ich meiner Familie, die mich immer wieder motiviert haben etwas für die Arbeit zu tun.